

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1936-1937

N° 1

Contribution au dosage
et à l'étalonnage biologique
de la Scille

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

présentée et soutenue le

1936

PAR

Louis LAUNAY

Pharmacien

Licencié ès sciences

Ancien Elève de l'Institut Pasteur

Interne de l'Hôpital de Nanterre

JURY } MM. GORIS, Président.
COUTIÈRE, Professeur.
MASCRÉ, Agrégé.

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

—
1936

CONTRIBUTION AU DOSAGE
ET A L'ÉTALONNAGE BIOLOGIQUE
DE LA SCILLE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551407_0079

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1936-1937

N° 1

Contribution au dosage
et à l'étalonnage biologique
de la Scille

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

présentée et soutenue le

1936

PAR

Louis LAUNAY

Pharmacien

Licencié ès sciences

Ancien Elève de l'Institut Pasteur

Interne de l'Hôpital de Nanterre

JURY

} MM. GORIS, Président.
COUTIÈRE, Professeur.
MASCRÉ, Agrégé.

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1936

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GUERIN, Doyen, O. $\star$, $\S$ I.
P. LEBEAU, Assesseur, O. $\star$, $\S$ I.
P. DESPORT, Secrétaire, $\star$, $\S$ I.

PROFESSEURS

MM. GUERIN, O. $\star$, $\S$ I. Botanique générale.
PERROT, C. $\star$, $\S$ I. Histoire naturelle des médicaments
COUTIERE, O. $\star$, $\S$ I. Zoologie.
LEBEAU, O. $\star$, $\S$ I. Pharmacie chimique.
BOUGAULT, $\star$, $\S$ I. Chimie analytique.
GORIS, O. $\star$, $\S$ I. Pharmacie galénique.
TASSILLY, O. $\star$, $\S$ I. Physique.
DAMIENS, $\star$, $\S$ I. Chimie minérale.
HERISSEY, O. $\star$, $\S$ I. Chimie biologique.
SOMMELET, $\star$, $\S$ I. Chimie organique.
LUTZ, $\star$, $\S$ I. Cryptogamie et Microbiologie
FABRE, $\star$, $\S$ I. Toxicologie.
LAUNOY, O. $\star$, $\S$ I. Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. $\star$, $\S$ I.

Professeurs honoraires : MM. DELEPINE, O. $\star$, $\S$ I. et GUERBET, $\star$, $\S$ I.
BEHAL, G. O. $\star$, $\S$ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. Marc HONNORAT, $\star$, $\S$ I. Législation et Déontologie pharmaceutiques
LAUNOY, O. $\star$, $\S$ I. Pharmacodynamie.
DELABY, $\star$, $\S$ I. Hydrologie et Hygiène
PICON, $\S$ I. Minéralogie.
BACH, $\S$ I. Microbiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, $\star$, $\S$ I.	MM. BACH, $\S$ I.
PICON, $\S$ I.	BEDEL, $\S$ I.
MASCRE, $\S$ I.	RÉGNIER, $\S$ I.
FLEURY, $\S$ I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, $\S$ I., agrégé, chargé des T. P. de 1^{re} année. Chimie générale.
FLEURY, $\S$ I. et RÉGNIER, $\S$ I. : agrégés,
chargés des travaux de Chimie analytique.
SOUÈGES, $\S$ I. Micrographie.
JEROUX, $\S$ I. Physique.
DEVAL, $\star$, $\S$ I. Microbiologie.
DELABY, $\star$, $\S$ I., PICON, $\S$ I. et MASCRE, $\S$ I. :
agrégés, chargés des travaux généraux de 4^e année.
Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, $\S$ I.



A MES GRANDS-PARENTS

A MES PARENTS

Faible témoignage de ma profonde affection et de ma reconnaissance infinie.

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A MES CAMARADES DE L'HÔPITAL DE NANTERRE

En souvenir de belles années et
en témoignage de vive amitié.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR TIFFENEAU

*Membre de l'Académie de Médecine
Professeur de Pharmacologie à la Faculté de Médecine
Pharmacien en chef de l'Hôtel-Dieu de Paris*

Qui a bien voulu nous diriger
dans nos recherches avec un bien-
veillant intérêt. Hommage de res-
pectueuse et profonde reconnais-
sance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GORIS

*Membre de l'Académie de Médecine
Professeur à la Faculté de Pharmacie
Directeur de la Pharmacie Centrale des Hôpitaux*

En témoignage de respectueuse
gratitude pour le grand honneur
qu'il nous a fait en acceptant de
présider cette thèse.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR COUTIÈRE

*Membre de l'Académie de Médecine
Professeur à la Faculté de Pharmacie*

Pour l'accueil bienveillant qu'il
nous a réservé.

Hommage très respectueux et
très reconnaissant.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MASCRÉ

*Professeur agrégé à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien en chef de l'Hôpital Lariboisière*

Dont les travaux ont inspiré cette thèse, et qui, au cours de nos recherches, n'a cessé de nous témoigner une grande bienveillance. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR TANON

*Membre de l'Académie de Médecine
Professeur à la Faculté de Médecine*

Pour le bienveillant intérêt qu'il
n'a cessé de nous témoigner au
cours de nos années d'internat.

A MONSIEUR RAYMOND CAHEN

*Docteur ès-Sciences naturelles
Pharmacien en chef de l'Hôpital de Nanterre*

Qui, partageant les difficultés de
ces recherches, n'a cessé de nous
guider avec la plus grande sollici-
tude. En hommage de notre pro-
fonde gratitude pour les facilités
de travail qu'il nous a accordées
et en témoignage de notre sincère
attachement.

CONTRIBUTION AU DOSAGE ET A L'ÉTALONNAGE BIOLOGIQUE DE LA SCILLE

INTRODUCTION

Comme la plupart des drogues végétales la Scille produit des effets thérapeutiques très variables, en raison des différences de teneur en principes actifs suivant l'origine et les conditions de la récolte. L'emploi clinique de ce cardiotonique nécessite donc son contrôle et son étalonnage, mais les méthodes auxquelles on a recouru jusqu'ici : vérification d'origine et essais chimiques ne s'avèrent pas suffisantes pour assurer la constance de son activité. Aussi la Conférence Internationale de Standardisation des médicaments de Francfort a-t-elle, en 1926, préconisé l'étude du dosage de la Scille par une méthode biologique. Aucune décision n'a toutefois été prise à ce sujet par les Conférences ultérieures.

Depuis 1926, l'étalonnage biologique de cette drogue a fait l'objet de recherches systématiques du Professeur BURN, en Angleterre, de MM. MASCRÉ, Jeanne LÉVY et CAHEN en France, recherches qui apportent une solution suffisante à ce problème. Nous avons tenté, cependant, de compléter les études de ces auteurs en mettant au point d'autres méthodes moins dispendieuses ou présentant des difficultés d'ordre matériel plus restreintes, soit en utilisant des

animaux qui font l'objet d'élevage systématique en France, soit en cherchant à mettre au point des méthodes réalisables sans difficulté dans tous les laboratoires et même les officines de pharmacien.

Une telle étude comprend, comme dans tous les dosages biologiques, trois points : l'essai des techniques de dosage sur l'animal, la recherche du mode optimum d'épuisement de la drogue en vue de préparer le soluté destiné à l'essai biologique — enfin le choix d'une préparation étalon.

Pour ce qui est des techniques de dosage biologique, quatre d'entre elles ont été mises au point dans ce travail. Partant de deux préparations galéniques de Scille, nous avons cherché à vérifier, par la constance des résultats, la valeur de ces méthodes. Pour tenter avec sécurité une telle étude nous avons envisagé en premier lieu des techniques voisines de celles qui avaient été éprouvées pour la Digitale, techniques de perfusion lente. Celles-ci, qui consistent à déterminer la mort de l'animal par arrêt du cœur en un temps donné en recourant à la perfusion lente, avaient fourni sur le chat (BURN) et le chien (MASCRE, Jeanne LÉVY et CAHEN) des résultats satisfaisants. Il restait à les appliquer à d'autres animaux, le cobaye et le lapin, qui présentaient vis-à-vis de la Scille une sensibilité très différente, ce qui rendait nécessaire de préciser les conditions expérimentales.

Les résultats obtenus se sont montrés suffisamment rigoureux pour qu'il soit possible d'étudier comparativement des techniques d'un tout autre ordre et encore moins onéreuses que les précédentes, utilisant comme test, soit l'action toxique sur le ventricule isolé d'animaux d'un prix peu élevé tels que l'escargot, soit des effets physiologiques non mortels (vomissement chez le pigeon), ce qui évite de sacrifier l'animal.

Il est donc possible, dans ce cas, d'utiliser une méthode statistique portant sur un grand nombre d'animaux et par conséquent plus rigoureuse. Parmi ces dernières méthodes, l'une qui nous est personnelle concerne le phénomène d'arrêt des battements de ventricules isolés d'*Helix pomatia*, placés dans des conditions de survie convenables et immergés dans des solutions de Scille. L'autre technique utilisée par le Professeur BURN pour la Digitale, concerne l'effet émétique de la Scille chez le Pigeon et consiste à déterminer le pourcentage d'animaux sensibles à cette action. On conçoit que, lors de sa publication, cette technique, basée sur l'effet vomitif des cardiotoniques et due à l'Américain HANZLICK, ait suscité un grand étonnement, car son principe est absolument contraire aux principes directeurs du dosage biologique. En effet, pour qu'un dosage biologique ait une valeur indiscutable, il est nécessaire, comme l'a formulé Sir Henry DALE, que le test utilisé soit voisin des effets cliniques. Néanmoins, l'application de cette méthode à la Scille nous a fourni des résultats absolument concordants avec ceux obtenus par les trois autres techniques. Ainsi nous avons dû nous rendre à l'évidence et reconnaître que cette technique se recommande, sinon par son principe, du moins par son exactitude.

Étant donné que toutes ces techniques aussi bien celles de perfusion lente que les méthodes statistiques, nous donnaient une précision et une constance suffisantes, il nous était permis d'aborder la recherche du mode optimum de préparation du soluté destiné au dosage biologique. En ce qui concerne la Digitale, les Conférences Internationales de Genève et de Francfort recommandaient indifféremment l'emploi d'un infusé aqueux ou d'une teinture alcoolique. Pour la Scille au contraire, les travaux de MASCRÉ, Jeanne LÉVY et CAHEN avaient montré la supériorité de l'infusé aqueux sur les teintures alcooliques par

la méthode de perfusion lente chez le chien. Nos recherches personnelles confirment les résultats des précédents auteurs pour les quatre méthodes physiologiques employées.

Un dernier problème qu'il était indispensable de résoudre, pour que les essais biologiques effectués deviennent comparables, est celui de la création d'une préparation étalon d'activité définie, de stabilité suffisante, permettant de déterminer, par comparaison avec celle-ci, la valeur des produits d'activité inconnue.

Les divers étalons proposés jusqu'alors sont l'ouabaïne, le scillarène, la teinture (BURN) et la poudre de Scille (MASCÉ, Jeanne LÉVY et CAHEN). Or, comme nous avons pu le constater, la sensibilité respective à la Scille et au scillarène est très différente suivant les animaux. Ce fait, qui est à rapprocher de la différence d'activité entre les drogues végétales : Kola Digitale et leurs principes actifs, constaté par de nombreux auteurs (Prof. GORIS, Prof. PERROT, Prof. POUCHET) montre que le scillarène, malgré son analogie d'activité pharmacologique avec la Scille, ne saurait convenir pour l'étalonnage de la drogue ; tout au plus peut-il servir d'*étalon secondaire*, c'est-à-dire selon un principe adopté par certaines pharmacopées étrangères pour d'autres produits, d'élément de comparaison en cas d'altération ou de renouvellement de l'étalon. L'étalon adopté dans nos essais est donc une préparation galénique de Scille, la poudre préparée selon la technique de MM. MASCÉ, Jeanne LÉVY et CAHEN.

Restait à préciser le titre qu'on devait exiger d'un tel étalon. Deux règles pouvaient être suivies à ce sujet, règles qui avaient été proposées successivement par les pharmacologues pour les étalons de Digitale.

En 1925 et 1928, adoptant l'opinion de MAGNUS, le Comité d'Hygiène de la Société des Nations avait décidé que la poudre étalon de Digitale serait un mélange de dix échantillons différents de poudres de Digitale d'activité variable, de façon à représenter l'activité moyenne des drogues employées en thérapeutique.

En 1932, pour la préparation de l'étalon national de Grande-Bretagne, en 1936, pour la préparation du nouvel étalon international de Digitale, un autre principe a été adopté : le choix comme poudre étalon de l'échantillon le plus actif. C'est ce second principe que nous avons cru devoir suivre pour préparer la poudre de Scille, destinée à servir d'étalon dans nos essais, et dont nous avons défini l'activité en unités arbitrairement choisies.

*
**

Ce travail comprend trois parties :

I. — *Etude expérimentale de quelques méthodes de dosage biologique de la Scille ;*

II. — *Etude de la valeur et de la précision des diverses méthodes ;*

III. — *Etude du choix et de la spécificité d'une préparation étalon de Scille stable.*

PREMIÈRE PARTIE

Etude expérimentale de quelques méthodes de dosage biologique de la Scille

A l'encontre des autres digitaliques le dosage biologique de la Scille, nécessaire à son étalonnage (33), n'a fait l'objet que d'un nombre limité de recherches. A notre connaissance, seules quatre techniques principales ont été expérimentées : perfusion lente chez le chat (BURN, 17; ROTHLIN, 123) et chez le chien (MASCRÉ, Jeanne LÉVY et CAHEN, 107), détermination de toxicité chez la grenouille par diverses méthodes (BURN, 17; Codex U.S.P.X.; ROSEN, 121; FOCKE, 51; COLSON et ENGELHARDT, 37; HAUPSTEIN, 81), augmentation d'amplitude d'oreillette isolée de lapin (BURN, 17). Toutes ces techniques donnent des résultats satisfaisants, mais elles sont onéreuses ou de réalisation difficile dans les laboratoires pharmaceutiques. Afin de parer à ces difficultés et dans le but d'effectuer une étude plus approfondie de la Scille et de ses préparations, nous avons tenté de mettre au point sur la Scille quatre autres méthodes de dosage biologique, dont trois, qui étaient déjà utilisées avec succès pour la Digitale, pouvaient être tentées *a priori* avec sécurité pour la Scille et dont la quatrième nous est personnelle.

Ces méthodes peuvent être classées en deux groupes ; les unes sont des méthodes de *perfusion lente* et consistent à déterminer la mort cardiaque chez le cobaye ou le lapin ; les autres sont des méthodes *statistiques* et consistent à rechercher le pourcentage de ventricules isolés d'escargot intoxiqués par la Scille ou le pourcentage de vomissement chez le pigeon. Ces méthodes ont été mises au point sur quatre poudres de Scille, d'origine différente. Il restait à préparer à partir de ces poudres un soluté physiologique contenant le maximum des principes actifs de la Scille. Ce problème, déjà posé pour la Digitale LIND VAN WIJNGARDEN, Conférences de Genève et Francfort), a été résolu pour la Scille elle-même : d'une part STASIAK, étudiant par perfusion chez le chat, des préparations alcooliques, donnait la préférence à celles qui étaient obtenues avec un alcool de titre dilué ; d'autre part, MM. MASCRÉ, Jeanne LÉVY et CAHEN, confirmant les résultats de STASIAK, trouvaient non seulement que l'alcool à 60° est un meilleur véhicule que l'alcool à 90°, mais encore observaient que l'infusé aqueux à 1 p. 200 était plus actif que la teinture alcoolique.

Les résultats de ces auteurs avaient été obtenus en utilisant comme méthode biologique la perfusion lente chez le chien. Il restait à vérifier si des conclusions analogues pouvaient être tirées en utilisant les méthodes biologiques que nous avons expérimentées, car il se pouvait, comme le signalaient d'ailleurs ces auteurs, que ces méthodes « exigent pour des raisons de commodité l'emploi de formes extractives différentes ». Sans reprendre les recherches systématiques de MM. MASCRÉ, Jeanne LÉVY et R. CAHEN, en ce qui concerne les divers modes d'extraction et les différents véhicules, nous nous sommes borné à étudier l'emploi des deux préparations que ces auteurs

avaient trouvé les plus actives, à savoir pour les préparations alcooliques, la teinture au 1/10 préparée par épuisement à l'aide d'alcool à 60° bouillant, et pour les préparations aqueuses, l'infusé fractionné à 1 p. 200. De plus, par la méthode de perfusion lente sur le cobaye et pour un certain nombre de poudres, nous avons cherché à vérifier si la concentration de l'Infusé à 1 p. 200 était suffisante et à cet effet nous avons comparé sa toxicité à celle d'Infusés plus dilués, à 1 p. 650 et 1 p. 1.200.

Après avoir, dans un premier chapitre, rappelé brièvement l'origine, la préparation des échantillons soumis aux essais, le mode d'épuisement suivi en vue de la préparation d'un soluté injectable, nous avons, dans deux autres chapitres, décrit les essais effectués par les méthodes de perfusion lente et les méthodes statistiques, en comparant pour chacune d'entre elles les résultats obtenus avec l'infusé aqueux et la teinture alcoolique de Scille.

CHAPITRE PREMIER

ORIGINE ET PRÉPARATION DES POUDRES DE SCILLE SOUMISES AUX ESSAIS

DIVERS MODES D'ÉPUISEMENT DE CES POUDRES EN VUE DE LA PRÉPARATION D'UNE SOLUTION INJECTABLE

Nous avons employé dans nos recherches quatre poudres différentes. La première nous a été fournie par la droguerie. C'est une poudre commerciale que nous appellerons « *Poudre 4* »; les trois autres, que nous appellerons « *Poudres 1, 2 et 3* », ont été préparées par pulvérisation et dessiccation minutieuse, au laboratoire, de bulbes d'*Urginea Scilla Steinh* récoltés en Tunisie. Les Poudres 1 et 2 provenant de la récolte 1932 ont été préparées par MM. MASCRÉ, Jeanne LÉVY et CAHEN (107). La Poudre 3 a été préparée par nous-même, dans les mêmes conditions, à partir de bulbes récoltés en 1934.

Après avoir décrit brièvement le mode de préparation de la poudre, la technique de la détermination de sa teneur en eau, nous rappellerons les modes d'épuisement de ces poudres en vue de la préparation d'un soluté injectable.

1° *Préparation des Poudres de Scille.*

Les bulbes de Scille sont traités de la façon suivante :

Après émondage, on incise la partie moyenne en fines lanières que l'on étale en couches minces et l'on dessèche à l'étuve, à 60°, pendant 3 jours, en retournant fréquemment. La drogue est alors concassée, pulvérisée en consistance demi-fine (tamis n° 45) et conservée en flacons paraffinés.

2° Détermination de la teneur en eau.

L'importance de la teneur en eau, dans la conservation des poudres de Digitale et de Scille, nous a incité à effectuer, avec une grande précision, cette détermination.

A cet effet, nous avons utilisé, pour les poudres expérimentées, quatre techniques différentes : séjour à l'étuve à 80°, à poids constant ; dessiccation par le vide phosphorique et le vide sulfurique ; enfin, la technique de BOUILLOT (11).

Rappelons que cette dernière consiste essentiellement à faire passer par entraînement à la trompe à vide un courant d'air sec sur le produit à dessécher, placé dans une cupule allongée, de façon à augmenter la surface d'évaporation, et portée à une température que nous avons fixée dans nos expériences à 80°. Cette techni-

TABLEAU 1

N° de la poudre	Poudre 1	Poudre 2	Poudre 3	Poudre 4
Teneur en eau	3,58	3,61	6,90	8,12

que nous a donné entière satisfaction : en quelques heures, en effet, elle nous a fourni des résultats identiques à ceux obtenus par les autres procédés, en plusieurs jours.

Pour chacun des modes de dessiccation, nous avons

opéré sur deux échantillons de 5 grammes, soit 8 échantillons pour chaque poudre.

Le tableau précédent comprend les teneurs en eau rapportées à 100 grammes de chacune de ces poudres.

3° *Divers modes d'épuisement de la drogue.*

Deux véhicules ont été utilisés, l'alcool à 60° et l'eau qui d'après MM. MASCRÉ, Jeanne LÉVY et CAHEN (106) permettent de préparer les solutions les plus actives. Adoptant de même les conclusions de ces auteurs nous nous sommes borné à utiliser parmi les techniques d'extraction : l'épuisement par l'alcool à 60° bouillant, et la double infusion aqueuse qui s'étaient montrés les techniques les meilleures. Nous rappellerons brièvement dans les lignes suivantes le mode opératoire employé.

a) *Epuisement par l'alcool à 60°.* — 250 grammes d'alcool à 60° sont portés à l'ébullition dans un appareil de KUMAGAWA. Au moment où commence l'ébullition on introduit dans la cartouche de cellulose 25 gr. de poudre de Scille et on maintient l'ébullition pendant cinq heures ; on laisse alors refroidir et on exprime le marc à la presse. Le liquide total obtenu est alors pesé et complété à 250 grammes.

b) *Epuisement par double infusion aqueuse.* — A 1 gr. de poudre de Scille, introduit dans un ballon de 250 cm³, on ajoute peu à peu, en agitant de façon à imbiber uniformément la poudre, 100 gr. d'eau distillée. On porte le tout au bain-marie bouillant jusqu'à ce que la température du mélange ait atteint 90°. On laisse refroidir un quart d'heure et, après avoir filtré, on ajoute 1 gr. 60 de chlorure de sodium afin de rendre la solution isotonique. Le marc est repris par 100 cm³ d'eau. Le tout est reporté à 90°. On filtre après refroidissement. Les deux liquides sont mélangés et complétés à 200 cm³. On obtient ainsi un infusé double à 1 p. 200 contenant 8 p. 1.000 de chlorure de sodium.

CHAPITRE II

METHODES DE DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ DE LA SCILLE PAR PERFUSION LENTE

Nos premières expériences de dosage biologique de la Scille ont consisté à mettre au point sur cette drogue une méthode déjà éprouvée pour d'autres cardiotoniques et adoptée par les Conférences Internationales de Standardisation Biologique des médicaments de Genève (1925) (138) et de Francfort (1928) (140), la méthode de perfusion lente. Rappelons que celle-ci consiste essentiellement à déterminer la plus petite dose de préparation médicamenteuse susceptible d'amener l'arrêt du cœur de l'animal par perfusion lente, régulière et continue en un temps déterminé. Etant donné que cette méthode avait été utilisée pour la Scille avec succès chez le chat (BURN, 17) et le chien (MASCÉ, Jeanne LÉVY et CAHEN, 106), nous pouvions tenter avec sécurité de l'appliquer à d'autres espèces animales; nous avons choisi à cet effet le cobaye et le lapin. Toutefois, comme ces animaux présentaient une sensibilité différente vis-à-vis de la Scille de celles du chat et du chien, il était nécessaire de préciser les conditions expérimentales.

Dans les deux chapitres qui vont suivre, nous envisageons successivement pour chaque méthode la mise au point des techniques et les essais effectués.

I

MÉTHODE DE DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ DE LA SCILLE PAR PERFUSION LENTE CHEZ LE COBAYE

L'adaptation au cobaye de la méthode de perfusion lente chez le chat (HATCHER et BROODY, 74) fut réalisée par KNAFFL-LENZ (86) en 1926 pour l'essai des teintures de *Strophantus* et *Digitale*. En dépit de nombreuses critiques (ALDAY-REDONNET, 1; EGGLESTON, 50; ROSEN, 121; VANDERKLEED, 145), cette méthode s'est vite répandue dans les divers laboratoires en raison de la facilité de son expérimentation, notamment en Angleterre (GAGE) et en France (Mlle LÉVY et K. OTTERSTROM). Confirmant les résultats de KNAFFL-LENZ, ces auteurs ont montré que cette méthode était de choix puisque facile, peu coûteuse et précise. Nous avons cherché à vérifier si cette méthode était applicable au dosage biologique des poudres de Scille.

Notre exposé comprend trois parties : la description des conditions expérimentales, le résumé des divers essais effectués, enfin, la comparaison de l'activité des préparations aqueuses et alcooliques.

§ 1. — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Après avoir résumé la technique expérimentale que nous avons mise au point pour la Scille, nous rappellerons la méthode de détermination de la dose minimum mortelle.

1° TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE. — Sans décrire ici

tous les détails de cette technique, exposée déjà par KNAFFL-LENZ et minutieusement étudiée par Mlle LÉVY et OTTERSTRÖM, nous signalerons les précautions que nous avons reconnues indispensables pour réaliser un dosage rigoureux de la Scille.

A. — *Choix des animaux.* — Chaque lot de cobayes est aussi homogène que possible ; il comprend toujours 10 animaux, de poids variant entre 250 et 500 gr. et comporte en général autant de mâles que de femelles, les femelles gravides étant éliminées.

B. — *Préparation des animaux et mode d'anesthésie.* — Les animaux privés de nourriture depuis 4 ou 5 heures sont anesthésiés, non à l'éther qui influe, chez les rongeurs, sur la précision de la méthode (HAAG, 61), mais à l'uréthane, employé à la dose de 1 gr. par kg en solution à 25 p. 100, par voie intra-péritonéale. Les résultats sont plus rapidement obtenus que par la voie sous-cutanée qu'utilisait KNAFFL-LENZ. L'anesthésie est presque toujours complète après 30 à 40 minutes et dure pendant toute l'expérience.

C. — *Précautions à observer au cours de la perfusion.* — Le liquide est perfusé dans la jugulaire, dans certaines conditions qu'il semble nécessaire d'observer pour obtenir des résultats constants. La respiration artificielle est inutile ; par contre, la durée de l'expérience doit être très voisine de 20 minutes et le volume de liquide perfusé, sensiblement constant, la dilution étant calculée de façon à obtenir une durée d'expérience sensiblement uniforme. La vitesse de la perfusion est réglée de la façon suivante : pendant une première période, qui se termine lorsque les battements de la carotide cessent d'être apparents, le liquide dilué est perfusé à une vitesse uniforme de 1 cc. 7 par kg et minute. Pendant une seconde période, la vitesse est diminuée de moitié.

D. — *Test de la mort cardiaque.* — L'expérience est considérée comme terminée lorsque les mouvements du

cœur ne sont plus perceptibles à travers la paroi thoracique, l'arrêt complet étant confirmé par l'observation après ouverture de la cage thoracique.

2° CALCUL DE LA DOSE MINIMUM MORTELLE. — Pour calculer la dose minimum mortelle, nous avons suivi les règles exprimées par BURN (14, 15) et K. COWARD (39), et, à l'encontre de LIND VAN WIJNGAARDEN (102), HASKELL (73 *bis*) et EGGLESTON (50), nous n'avons pas écarté des moyennes les chiffres aberrants. La dose minimum mortelle moyenne est la moyenne des chiffres obtenus dans la totalité des essais.

Elle se détermine par la formule suivante :

$$M = \left(\frac{m'}{p'} + \frac{m''}{p''} + \frac{m^n}{p^n} \right) \frac{1}{n}$$

formule dans laquelle m représente le poids de poudre de Scille anhydre injecté pour amener la mort, p=le poids du cobaye, n=le nombre d'essais.

§ 2. — ESSAIS EFFECTUES

Nous avons groupé, dans une série de tableaux, les expériences que nous avons effectuées ; en premier lieu sur les préparations alcooliques ; en second lieu, sur les préparations aqueuses : à savoir les infusés à 1 p. 200 et les infusés plus dilués.

Dans chacun des tableaux, figurent :

- 1° Le sexe des animaux utilisés ;
- 2° Leur poids en grammes ;
- 3° Le nombre de cm³ qui leur a été perfusé par kg et par minute,
- 4° Le nombre de cm³ perfusés pour obtenir l'arrêt du cœur ;

5° Le nombre de cm^3 perfusés par kg pour obtenir l'arrêt du cœur;

6° Le temps nécessaire à l'arrêt du cœur;

7° Le nombre de mg. de poudre de Scille perfusés par kg.

1° ESSAI DES PRÉPARATIONS ALCOOLIQUES (1).

Nous avons dosé sur le cobaye trois colatures alcooliques de Scille, préparées respectivement par épuisement des poudres 1, 2 et 4.

Pour l'essai physiologique, la teinture au 1/10 a été diluée de 25 à 40 fois dans le sérum physiologique à 8 pour 1.000, cette dilution étant calculée afin que la durée de l'expérience soit voisine de 20 minutes. Les essais effectués sur chaque colature sont consignés dans les tableaux 2, 3 et 4.

Telle qu'elle apparaît dans le tableau 2, la dose minimum mortelle moyenne de la poudre 1 est de 54 mgr. 8, exprimée en poudre anhydre.

Déterminée par perfusion lente sur le cobaye la dose minimum mortelle moyenne de la poudre n° 2 est de 46 mg. 39, exprimée en poudre anhydre (tableau 3).

La dose minimum mortelle moyenne de la poudre n° 4 est de 90 mg. 43, exprimée en poudre anhydre (tableau 4).

(1) Au préalable, nous avons, sur des animaux témoins, observé que l'alcool se prête à la préparation d'un soluté injectable par perfusion au cobaye et n'exerce sur cet animal aucune action toxique. En effet la perfusion d'une solution d'alcool éthylique de même titre que la teinture et diluée dans les mêmes conditions est sans effet toxique sur quatre témoins.

TABLEAU 2. — *Colature obtenue par épuisement par l'alcool à 60° bouillant (Poudre 1).*

Sexe et Poids (g.)	Nombre de cm ³ perfusés par minute et kg.	Nombre de cm ³ perfusés	Nombre de cm ³ perfusés par kg.	Temps nécessaire à l'arrêt du cœur (minutes)	Nombre de mg. de Scille perfusés par kg.
♂ 290	1,72	8,6	29,6	19	68,1
♂ 320	1,80	6,9	21,5	13	49,5
♂ 335	1,70	11	32,8	21	75,5
♂ 370	1,66	8,9	24,0	16	55,3
♀ 326	1,84	8,5	26,0	20	60,2
♀ 380	1,57	9,6	25,2	18	58,0
♀ 360	1,66	8,4	23,3	16	53,4
♀ 370	1,62	8,1	21,8	16	49,3
♂ 360	1,66	8,1	22,2	15	51,0
♀ 395	1,51	5,3	13,4	10	49,3

TABLEAU 3. — *Colature obtenue par épuisement par l'alcool à 60° bouillant (Poudre 2).*

Sexe et Poids (g.)	Nombre de cm ³ perfusés par minute et kg.	Nombre de cm ³ perfusés	Nombre de cm ³ perfusés par kg.	Temps nécessaire à l'arrêt du cœur (minutes)	Nombre de mg. de Scille perfusés par kg.
♀ 410	1,68	9,3	22,6	15	52,7
♀ 300	1,66	7,2	20	13	46,5
♂ 340	1,73	6,1	17,9	12	41,0
♂ 415	1,68	9,02	21,7	16	50,5
♀ 420	1,66	7	16,6	12	38,6
♀ 440	1,60	9,1	20,6	16	48,0
♂ 460	1,52	9,8	21,3	16	49,2
♂ 400	1,5	9,3	23,2	17	53,9
♀ 400	1,5	8,7	21,7	16	50,5
♀ 345	1,73	7,6	21,1	15	49,0

TABLEAU 4. — *Colature obtenue par épuisement par l'alcool à 60° bouillant (Poudre 4).*

Sexe et Poids (g.)	Nombre de cm ³ perfusés par minute et kg.	Nombre de cm ³ perfusés	Nombre de cm ³ perfusés par kg.	Temps nécessaire à l'arrêt du cœur (minutes)	Nombre de mg. de Scille perfusés par kg.
♀ 361	1,61	6	16,3	12	81,5
♀ 368	1,60	7	19	14	95
♂ 468	1,29	8,3	17,7	16	88,6
♀ 394	1,50	11,3	28,6	20	114
♀ 497	1,21	8,6	17,2	20	75
♀ 378	1,58	6,6	17,5	14	84
♂ 345	1,72	10,5	30,4	19	121
♂ 464	1,29	10,2	21,9	22	100
♂ 400	1,50	8	20	18	107
♂ 422	1,42	9,6	22,7	21	118

Les doses minima mortelles des poudres de Scille n° 1, 2 et 4, déterminées par perfusion lente, en un temps voisin de 20 minutes, d'une colature alcoolique, chez un cobaye anesthésié à l'uréthane, sont donc, respectivement, de 54 mg. 8, 46 mg. 3 et 90 mg. 4, exprimées en poudre anhydre.

2° ESSAI DES PRÉPARATIONS AQUEUSES

Nous avons dosé par la même méthode physiologique quatre poudres de Scille épuisées par infusion aqueuse fractionnée suivant la technique ci-dessus décrite (p. 23). Dans la plupart des cas, nous avons adopté le titre de 1 p. 200 préconisé par MM. MASCRÉ, J. LÉVY et CAHEN (107). De plus, nous demandant si cette dilution suffisait pour extraire la totalité des principes actifs, nous avons parallèlement

étudié la toxicité des infusés à 1 p. 650, 1 p. 1.200. Nous indiquerons successivement les résultats pour les divers modes d'extraction.

A) *Essai de l'infusé à 1 p. 200.*

Pour l'essai biologique, ces infusés sont dilués dans 2, 4 ou 5 parties de sérum physiologique de façon à obtenir la mort du cobaye en un temps voisin de 20 min. Les essais effectués sur les poudres 1, 2, 3, 4 sont consignés dans les tableaux 5, 6, 7, 8.

TABLEAU 5. — *Colature obtenue par épuisement par double infusion aqueuse à 1 p. 200 (Poudre 1).*

Sexe et Poids (g.)	Nombre de cm ³ perfusés par minute et kg.	Nombre de cm ³ perfusés	Nombre de cm ³ perfusés par kg.	Temps nécessaire à l'arrêt du cœur (minutes)	Nombre de mg. de Scille perfusés par kg.
♂ 500	1,7	17,02	34,0	24	34,0
♀ 300	1,7	12,79	32,6	21	32,6
♀ 320	1,7	12,40	39,7	24	38,7
♀ 300	1,7	8,5	28,3	19	35,4
♀ 357	1,7	10,80	33,2	20	37,8
♀ 330	1,7	7,32	22,1	14	27,6
♂ 370	1,7	9,52	25,7	16	32,1
♂ 480	1,7	11,44	23,8	14	29,7
♂ 445	1,7	12,6	28,31	18	35,3
♂ 392	1,7	11,78	30,0	19	36,3

Telle qu'elle apparaît dans le tableau 5, la dose minimum mortelle moyenne de la poudre 1 est de 32 mg. 74, exprimée en poudre anhydre.

TABLEAU 6. — *Colature obtenue par épuisement par double infusion aqueuse à 1 p. 200 (Poudre 2).*

Sexe et Poids (g.)	Nombre de cm ³ perfusés par minute et kg.	Nombre de cm ³ perfusés	Nombre de cm ³ perfusés par kg.	Temps nécessaire à l'arrêt du cœur (minutes)	Nombre de mg. de Scille perfusés par kg.
♂ 500	1,7	15,35	30,7	21	30,7
♂ 302	1,7	8,49	28,3	18	28
♀ 350	1,7	9,8	28	19	28
♀ 340	1,7	16,26	36	23	36
♂ 362	1,7	8,76	24,1	16	24,1
♂ 342	1,7	10,2	29,5	20	29,5
♂ 445	1,7	12,5	28,0	19	28,0
♂ 470	1,7	14,3	30,4	20	30,4
♀ 347	1,7	8,4	24,2	14	24,2
♀ 415	1,7	10,1	24,3	17	24,3

Comme il apparaît dans ce tableau (tableau 6) la dose minimum mortelle moyenne de la poudre 2 est de 27 mg. 35, exprimée en poudre anhydre.

TABLEAU 7. — *Colature obtenue par épuisement par double infusion aqueuse à 1 p. 200 (Poudre 3).*

Sexe et Poids (g.)	Nombre de cm ³ perfusés par minute et kg.	Nombre de cm ³ perfusés	Nombre de cm ³ perfusés par kg.	Temps nécessaire à l'arrêt du cœur (minutes)	Nombre de mg. de Scille perfusés par kg.
♀ 450	1,7	10,2	22,6	15	34,8
♀ 330	1,7	7,38	22,3	15	34,4
♀ 390	1,7	6,52	16,7	11	25,6
♂ 677	1,7	11,60	18,1	12	26,3
♂ 378	1,7	6,65	17,5	11	26,9
♂ 310	1,7	8,70	20,8	19	43,1
♂ 420	1,7	6,4	15,2	11	30,4
♀ 390	1,7	8,72	22,3	13	25,6
♀ 395	1,7	5,9	14,9	10	29,8
♀ 472	1,7	6,7	14,1	14	28,3

Ainsi, la dose minimum mortelle moyenne de la poudre 3 (tableau 7) est de 29 mg. 3, exprimée en poudre anhydre.

TABLEAU 8. — *Colature obtenue par épuisement par double infusion aqueuse à 1 p. 200 (Poudre 4).*

Sexe et Poids (g.)	Nombre de cm ³ perfusés par minute et kg.	Nombre de cm ³ perfusés	Nombre de cm ³ perfusés par kg.	Temps nécessaire à l'arrêt du cœur (minutes)	Nombre de mg. de Scille perfusés par kg.
♂ 400	1,7	11,64	29,0	17	72,6
♂ 420	1,7	11,9	28,3	17	70,8
♂ 461	1,7	10,8	23,4	15	58,5
♂ 325	1,7	10,95	33,6	22	84
♂ 402	1,7	11,8	29,5	18	73,3
♀ 530	1,7	14,6	27,5	18	68,8
♀ 426	1,7	12,5	29,3	16	73,3
♀ 517	1,7	18,5	35,7	23	71,4
♀ 432	1,7	15,4	35,6	22	71,2
♀ 442	1,7	15,9	35,9	22	71,8

Comme il apparaît dans le tableau ci-dessus (tableau 8), la dose minimum mortelle moyenne de la poudre 4 est de 65 mg. 7, exprimée en poudre anhydre.

Ainsi, les doses minima mortelles des poudres de Scille n° 1, 2, 4 et 3, déterminées par perfusion lente d'une infusion aqueuse à 1 p. 200, en un temps voisin de 20 minutes, chez le cobaye anesthésié à l'uréthane, sont, respectivement, de 32 mg. 7, 27 mg. 3, 29 mg. 3 et 67 mg. 7 de poudre anhydre.

B. — *Essai des infusés à 1 p. 650 et 1 p. 1200.*

Pour l'essai physiologique, ces Infusés sont perfusés sans dilution ultérieure. Un dosage a été effectué à l'aide d'un infusé à 1 p. 1200 (poudre 2, tableau 9). Un essai a été effectué sur un Infusé à 1 p. 650 (poudre 3, tableau 10).

TABLEAU 9. — *Colature obtenue par épuisement par double infusion aqueuse à 1 p. 1200 (Poudre 2).*

Sexe et Poids (g.)	Nombre de cm ³ perfusés par minute et kg.	Nombre de cm ³ perfusés	Nombre de cm ³ perfusés par kg.	Temps nécessaire à l'arrêt du cœur (minutes)	Nombre de mg. de Scille perfusés par kg.
♂ 312	1,7	9,4	30,1	21	25
♂ 300	1,7	10,5	35	24	29,1
♂ 295	1,7	9	30,5	21	24,4
♀ 325	1,7	13,1	40,3	24	33,5
♀ 415	1,7	12,3	29,6	20	24,7
♀ 320	1,7	10	31,4	20	26,1
♀ 353	1,7	10,2	28,9	19	25
♀ 382	1,7	13,9	36,3	23	30,1
♂ 310	1,7	12,6	40	25	33,3
♂ 362	1,7	9,2	25,6	18	21,3

Ainsi, la dose minimum mortelle moyenne de la poudre 2 (tableau 9) est de 26 mg. 2, exprimée en poudre anhydre.

TABLEAU 10. — *Colature obtenue par épuisement par double infusion aqueuse à 1 p. 650 (Poudre 3).*

Sexe et Poids (g.)	Nombre de cm ³ perfusés par minute et kg.	Nombre de cm ³ perfusés	Nombre de cm ³ perfusés par kg.	Temps nécessaire à l'arrêt du cœur (minutes)	Nombre de mg. de Scille perfusés par kg.
♀ 350	1,7	6,5	18,5	12	28,5
♀ 378	1,7	8,1	21,5	13	30
♂ 547	1,7	10,9	20	12	30,7
♂ 465	1,7	8,4	18	11	27,7
♂ 475	1,7	9,4	19,7	14	30,3
♂ 540	1,7	10,4	19,3	13	29,7
♂ 550	1,7	8,7	15,9	11	24,4
♀ 420	1,7	8,9	21,1	14	34,1
♀ 400	1,7	9,8	24,5	15	37,6
♀ 510	1,7	8,7	17	14	26,2

La dose minimum mortelle moyenne de la poudre 3 est de 27 mg. 8, exprimée en poudre anhydre.

Ainsi, déterminée par perfusion lente chez le cobaye en un temps voisin de 20 minutes, la dose minimum mortelle de la poudre 2 épuisée par double infusé à 1 p. 1200 est de 26 mg. 3, exprimée en poudre anhydre. Déterminée par la même méthode physiologique, la dose minimum mortelle moyenne de la poudre 4 épuisée par un infusé à 1 p. 650, est de 27 mg. 8.

§ 3. — ACTIVITÉ COMPARÉE DES PRÉPARATIONS AQUEUSES ET ALCOOLIQUES

Si l'on compare les résultats des diverses expériences effectuées, à partir d'une même poudre, avec l'infusé aqueux et la teinture alcoolique, dans tous

les cas, il est possible de conclure à une différence d'activité très nette, entre ces deux préparations. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n° 11, dans lequel, attribuant arbitrairement la valeur 100 à l'infusé à 1 p. 200, nous avons indiqué les toxicités des préparations alcooliques et des infusés aqueux.

TABLEAU 11. — *Valeurs comparées de diverses préparations d'une même poudre.*

N° des poudres	Nature de l'épuisement		
	Infusé à 1 p. 1200 et 1 p. 650	Infusé à 1 p. 200	Teinture à 1 p. 10
1		100	59
2	104	100	58
4		100	70
3	105	100	

L'examen de ce tableau montre que l'infusé aqueux à 1 p. 200 est 30 à 40 pour 100 plus actif que la teinture alcoolique. Ces résultats sont analogues à ceux obtenus par MM. MASCRÉ, Jeanne LÉVY et CAHEN, en utilisant la méthode de perfusion lente sur le chien. De plus la toxicité de l'infusé à 1 p. 650 ou à 1 p. 1200 apparaît dans deux cas voisine de celle de l'infusé à 1 p. 200. Ainsi l'état actuel de ces recherches permet de conclure qu'en opérant par perfusion lente chez le cobaye, la forme injectable la meilleure en raison de son activité est l'infusé aqueux à 1 p. 200.

CONCLUSIONS

1° La méthode de perfusion lente chez le cobaye est susceptible d'être employée avec succès au dosage biologique de la Scille.

2° Les résultats obtenus par cette méthode sont constants, à condition de maintenir le temps d'expérience aussi uniforme que possible et d'utiliser au moins dix animaux.

3° L'infusé fractionné à 1 p. 200, la teinture préparée par épuisement par l'alcool à 60° bouillant, se prêtent l'un et l'autre à la préparation de la solution nécessaire à l'essai biologique sur le cobaye; l'infusé aqueux, étant de 30 à 40 p. 100 plus actif que la teinture alcoolique, constitue le meilleur mode d'épuisement.

II

MÉTHODE DE DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ DE LA SCILLE PAR PERFUSION LENTE SUR LE LAPIN

La méthode de perfusion lente chez le cobaye présente, comme nous avons dû le reconnaître, un inconvénient: la difficulté de se procurer ces animaux en nombre suffisant à certaines époques. Dans ces conditions, nous avons songé à utiliser un autre animal qui fait l'objet d'un élevage plus répandu: le lapin.

La méthode de perfusion lente chez cet animal, décrite dès 1907 par le Pharmacien DEJEAN (43) n'a été

que rarement appliquée au dosage des digitaliques. Mise au point en 1930 par NYIRI et DUBOIS (111) pour la Digitale, cette méthode nécessite, en raison de l'hyposensibilité de l'animal à cette drogue, une technique particulière, à savoir une intoxication complémentaire par perfusion d'ouabaine. Cette technique employée pour d'autres animaux par HATCHER et BROODY (74), manque de précision d'après divers auteurs (MAGNUS, STORM VAN LEUVEN, SLUYTERS, 129 et LIND VAN WIJNGAARDEN, 102). Cette critique nous aurait fait rejeter l'emploi du lapin pour le dosage de la Scille, si des essais préliminaires ne nous avaient pas montré la curieuse hypersensibilité de cet animal vis-à-vis de la Scille. Nos expériences entreprises depuis février 1934 ont été confirmées en septembre 1935 par les travaux de RAPSON et UNDERHILL (120) qui, dans une étude générale d'essai des cardiotoniques, ont également utilisé le lapin pour doser les teintures de Scille.

Après avoir, dans une première partie, étudié les conditions expérimentales permettant d'appliquer au lapin l'essai biologique de la Scille, nous avons, dans une seconde partie, effectué le dosage de préparations alcooliques et aqueuses de trois poudres de Scille.

§ 1. — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Dans ses grandes lignes, la technique de perfusion lente sur le lapin est identique à celle que l'on emploie sur le cobaye, à savoir : l'injection dans la jugulaire chez l'animal anesthésié, non soumis à la respiration artificielle.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Nous nous bornerons à signaler les précautions nécessaires pour obtenir un dosage rigoureux.

A. — CHOIX DES ANIMAUX. — Les lapins utilisés sont d'un poids variant entre 1 kg 500 et 2 kg 500. Le sexe est indifférent, mais on rejette les femelles gravides.

B. — NOMBRE D'ANIMAUX UTILISÉS POUR CHAQUE ESSAI. — Le nombre d'animaux utilisés par NYIRI et DUBOIS varie essentiellement avec les résultats obtenus. Ces auteurs adoptant la suggestion de TREVAN conviennent de poursuivre les dosages jusqu'à ce que les chiffres aberrants perdent leur influence sur la moyenne générale. Cependant, ils indiquent qu'en général 4 à 5 animaux suffisent par essai. Nous avons préféré utiliser au moins 6 animaux. Un même nombre a été adopté par RAPSON et UNDERHILL.

C. — MODE D'ANESTHÉSIE. — Les bons résultats obtenus sur le cobaye avec l'uréthane administré par voie intra-péritonéale nous ont fait choisir ce mode d'anesthésie chez le lapin de préférence à l'éther et aussi au pernocton intra-veineux de NYIRI et DUBOIS. Le choix de cet anesthésique nous permettait en outre d'éviter la respiration artificielle, nécessaire dans les expériences de RAPSON et UNDERHILL (120), qui pratiquaient l'anesthésie à l'éther.

D. — PRÉCAUTIONS A OBSERVER AU COURS DE LA PERFUSION. — a) *Température, concentration du liquide de perfusion.* — Contrairement à ces derniers auteurs, le liquide de perfusion n'a pas été porté à 40°, mais il fut administré à la température du laboratoire (18 à 20°).

b) *Concentration du liquide de perfusion.* — RAPSON et UNDERHILL, perfusaient une teinture privée d'alcool par évaporation préalable et diluée ultérieurement. Nous avons utilisé, soit une colature alcoolique diluée sans évaporation dans le sérum physiologique à 8 p. 1000, soit un infusé à 1 p. 200 dilué dans les mêmes conditions.

c) *Vitesse de la perfusion.* — La vitesse de perfusion est maintenue uniforme pendant la plus grande partie de l'expérience. Cependant, comme pour le cobaye, nous

avons diminué la vitesse de moitié après avoir observé l'affaissement de la carotide.

E. — TEST DE LA MORT CARDIAQUE. — De même que RAPSON et UNDERHILL, nous avons pris comme test de l'intoxication cardiaque, l'arrêt du myocarde. Ce test nous a paru aussi précis que pour le cobaye. NYIRI et DUBOIS notaient la chute de la pression carotidienne.

F. — DURÉE DE L'EXPÉRIENCE. — Pour que les expériences soient rigoureuses, nous avons reconnu nécessaire d'adopter comme durée moyenne de perfusion un temps voisin de 30 minutes.

La durée choisie par RAPSON et UNDERHILL, à savoir 20 minutes, nous paraît peu convenable pour la fixation complète de la drogue.

§ 2. — ESSAIS EFFECTUÉS

Par cette méthode nous avons procédé à l'essai biologique de 3 poudres de Scille. Pour chacune de ces poudres, nous avons préparé une teinture alcoolique et un Infusé aqueux dans les mêmes conditions que pour les essais sur le cobaye. Nous suivrons dans l'exposé de nos expériences le même plan que dans le chapitre précédent. Nous envisagerons donc, en premier lieu, l'essai des préparations alcooliques et en second lieu l'essai des Infusés aqueux à 1 p. 200. La toxicité de chaque préparation a été déterminée sur 6 lapins. Comme nous l'avons exposé plus haut, la dose minimum mortelle moyenne est exprimée en poudre anhydre.

1° ESSAI DES PRÉPARATIONS ALCOOLIQUES

Trois poudres de Scille (n^{os} 1, 2 et 4) ont été épuisées par l'alcool à 60° bouillant ⁽¹⁾ et perfusées après

(1) Dans les conditions de l'expérience, l'alcool comme pour le cobaye n'exerce aucune action toxique.

dilution telle de la colature que la durée de l'expérience soit voisine de trente minutes.

TABLEAU 12. — *Colature obtenue par épuisement par l'alcool à 60° bouillant (Poudre 1).*

Sexe et Poids (g.)	Nombre de cm ³ perfusés par minute et kg.	Nombre de cm ³ perfusés	Nombre de cm ³ perfusés par kg.	Temps nécessaire à l'arrêt du cœur (minutes)	Nombre de mg. de Scille perfusés par kg.
♂ 2.030	0,25	16,2	8	32	36,8
♀ 1.960	0,25	14,4	7,8	29	36,1
♂ 2.185	0,2	19,1	8,3	41	38,4
♂ 2.125	0,2	17,2	8,1	41	36,8
♀ 2.025	0,2	14,2	7	35	32,2

Telle qu'elle résulte du tableau précédent (tableau 12), la dose minimum mortelle moyenne de la poudre 1 est de 35 mg., exprimée en poudre anhydre.

Celle de la poudre 2 dont l'essai figure au tableau 13 est de 29 mg. 1.

TABLEAU 13. — *Colature obtenue par épuisement par l'alcool à 60° bouillant (Poudre 2).*

Sexe et Poids (g.)	Nombre de cm ³ perfusés par minute et kg.	Nombre de cm ³ perfusés	Nombre de cm ³ perfusés par kg.	Temps nécessaire à l'arrêt du cœur (minutes)	Nombre de mg. de Scille perfusés par kg.
♂ 1.600	0,2	11,5	7,2	35	33,5
♂ 2.360	0,2	19,2	8,1	41	37,3
♂ 1.750	0,2	9,6	5,5	28	25,5
♀ 2.080	0,2	11,4	5,4	28	25,4
♀ 1.890	0,2	11,5	5,7	23	27,9
♀ 2.460	0,4	17	6,9	17	32,1

La dose minimum mortelle moyenne de la poudre 4 (tableau 14) est de 125 mg., exprimée en poudre anhydre.

TABLEAU 14. — *Colature obtenue par épuisement par l'alcool à 60° bouillant (Poudre 4).*

Sexe et Poids (g.)	Nombre de cm ³ perfusés par minute et kg.	Nombre de cm ³ perfusés	Nombre de cm ³ perfusés par kg.	Temps nécessaire à l'arrêt du cœur (minutes)	Nombre de mg. de Scille perfusés par kg.
♂ 1.600	0,2	10,7	6,7	34	134
♀ 1.550	0,2	10,1	6,5	31	130,8
♀ 2.315	0,2	14,5	6,2	31	126
♀ 1.870	0,2	13,7	7,3	37	146
♂ 1.640	0,2	20,2	12,3	41	150
♂ 2.060	0,2	34,1	16,5	15	132

Ainsi les doses minima mortelles moyennes des poudres 1, 2 et 4 épuisées par l'alcool à 60° bouillant et dosées par la méthode de perfusion lente sur le lapin, sont respectivement de 35 mg. 9, 29 mg. 1 et 125 mg., exprimées en poudre anhydre.

2° ESSAI DES PRÉPARATIONS AQUEUSES

Nous avons dosé par la même méthode physiologique trois poudres de Scille épuisées par un infusé à 1 p. 200, qui a été dilué pour la perfusion dans 5 parties de sérum physiologique.

TABLEAU 15. — *Colature obtenue par épuisement par double infusion aqueuse à 1 p. 200 (Poudre 1).*

Sexe et Poids (g.)	Nombre de cm ³ perfusés par minute et kg.	Nombre de cm ³ perfusés	Nombre de cm ³ perfusés par kg.	Temps nécessaire à l'arrêt du cœur (minutes)	Nombre de mg. de Scille perfusés par kg.
♂ 1.725	0,2	12,2	7	36	23,6
♂ 1.885	0,2	8,7	4,6	23	15,4
♂ 1.855	0,2	7,4	4	20	13,5
♀ 1.810	0,2	10,9	6	30	20,3
♀ 1.830	0,2	10,4	5,6	28	18,9
♀ 1.960	0,2	9,2	4,6	23	15,6

Il résulte du tableau 15 que la dose minimum mortelle moyenne de la poudre 1, est de 16 mg. 6, exprimée en poudre anhydre. Celle de la poudre 2 est de 17 mg. 25 (tableau 16).

TABLEAU 16. — *Colature obtenue par épuisement par double infusion aqueuse à 1 p. 200 (Poudre 2).*

Sexe et Poids (g.)	Nombre de cm ³ perfusés par minute et kg.	Nombre de cm ³ perfusés	Nombre de cm ³ perfusés par kg.	Temps nécessaire à l'arrêt du cœur (minutes)	Nombre de mg. de Scille perfusés par kg.
♀ 1.915	0,2	9,1	4,7	24	15,8
♂ 1.610	0,2	10	5,5	28	18,8
♂ 1.935	0,2	11,4	5,8	30	19,6
♂ 1.865	0,2	6,8	3,6	18	12,2
♀ 1.750	0,2	11,4	6,5	32.30	21,7
♀ 1.665	0,2	14,5	8,7	44	21,7

La dose minimum mortelle de la poudre 4 est de 67 mg. 9, exprimée en poudre anhydre (tableau 17).

TABLEAU 17. — *Colature obtenue par épuisement par double infusion aqueuse à 1 p. 200 (Poudre 4).*

Sexe et Poids (g.)	Nombre de cm ³ perfusés par minute et kg.	Nombre de cm ³ perfusés	Nombre de cm ³ perfusés par kg.	Temps nécessaire à l'arrêt du cœur (minutes)	Nombre de mg. de Scille perfusés par kg.
♂ 2.000	0,50	27,2	13	30	68
♂ 2.030	0,49	31	15,2	31	76,3
♀ 2.025	0,45	35,2	17,4	39	87
♂ 1.930	0,44	26,8	13,9	37	69,5
♀ 2.120	0,46	23,5	11	24	55,4
♀ 1.842	0,25	36,6	19,7	62	98

Ainsi, les doses minima mortelles moyennes des poudres 1, 2 et 4, épuisées par double infusion aqueuse à 1 p. 200 et dosées par la méthode de perfusion lente sur le lapin sont respectivement de 16 mg. 6, 17 mg 25 et 67 mg. 9, exprimées en poudre anhydre.

§ 3. — ACTIVITE COMPAREE DES PREPARATIONS AQUEUSES ET ALCOOLIQUES

Pour cette méthode comme pour la précédente, une grande différence d'activité sépare la préparation alcoolique de l'infusé aqueux. Comme le montre le tableau suivant, cet infusé à 1 p. 200 est de 40 à 50 p. 100 plus actif que la teinture. Cette différence correspond à celles qui ont été observées sur le chien et le cobaye.

TABLEAU 18. — *Valeurs comparées de diverses préparations d'une même poudre titrées par perfusion lente sur le lapin.*

N ^o des poudres	Nature de l'épuisement	
	Infusé à 1 p. 200	Teinture à 1 p. 10
1	100	50
2	100	60
4	100	55

Ainsi, en opérant par perfusion lente chez le lapin, la forme injectable la meilleure, parce que la plus active, est l'infusé aqueux à 1 p. 200.

CONCLUSIONS

1) La méthode de perfusion lente d'HATCHER-MAGNUS est susceptible d'être appliquée avec succès sur le Lapin, au dosage biologique de la Scille.

2) La grande sensibilité de ce rongeur vis-à-vis de la Scille permet d'obtenir la mort cardiaque de l'animal en un temps voisin de trente minutes, avec une vitesse de perfusion assez lente, et sans qu'il soit nécessaire de recourir à une injection complémentaire d'ouabaïne, comme pour la Digitale.

3) Les résultats obtenus par cette méthode en utilisant seulement 6 animaux sont relativement constants.

4) Le meilleur mode d'épuisement de la Scille pour l'essai biologique sur le Lapin est l'Infusé aqueux à 1 p. 200.

CHAPITRE III

METHODES STATISTIQUES DE DOSAGE BIOLOGIQUE DE LA SCILLE

Les méthodes que nous avons envisagées dans le chapitre précédent, quelles que soient leur fidélité et leur rigueur, nécessitent, pour être très précises, l'emploi d'un grand nombre d'animaux. Ce fait tient non seulement aux difficultés techniques et à la complexité de l'action pharmacodynamique, mais encore et principalement aux variations de sensibilité du matériel vivant.

Au contraire, les méthodes statistiques de détermination des pourcentages de mortalité ou d'activité par administration de doses variées, méthodes introduites dans la science par TREVAN (143) et basées précisément sur les variations de sensibilité des animaux, offrent une plus grande sécurité pour le dosage biologique. TREVAN a montré en effet qu'il est possible d'admettre, tout au moins pour les doses voisines de la dose minimum mortelle, que le pourcentage des mortalités varie proportionnellement aux doses administrées. Partant de cette donnée on peut établir la toxicité ou l'activité d'une substance médicamenteuse sans avoir à en déterminer la dose minimum mortelle ou la dose minimum d'action.

En ce qui concerne la Scille, l'une de ces méthodes, déterminant les pourcentages de mortalité pour dif-

férentes doses de drogue a été utilisée par BURN (16) sur la grenouille (méthode de TREVAN adoptée par le Codex britannique). Nous avons cru faire un travail original en mettant au point, pour la Scille, deux autres méthodes basées sur ce principe de TREVAN. L'une, qui nous est personnelle, consiste à déterminer le pourcentage d'arrêt de ventricules isolés d'escargot, maintenus dans des conditions de survie suivant la technique désormais classique de CARDOT (28, 29, 30). L'autre, basée sur le test de l'Américain HANZLICK (66), l'effet émétique des cardiotoniques sur le pigeon, a été mise au point par BURN (19) pour le dosage de la Digitale.

Dans le chapitre suivant, nous examinons successivement les essais effectués en utilisant ces deux méthodes.

I

MÉTHODE STATISTIQUE DE TOXICITÉ SUR LE VENTRICULE ISOLÉ D'*HELIX POMATIA*

Le ventricule isolé d'*Helix pomatia* permet au pharmacologue d'effectuer dans des conditions rigoureuses et économiques l'étude des cardiotoniques. Dans des travaux aujourd'hui classiques, le Professeur CARDOT (28, 29, 30) a montré en effet que cet organe peut, non seulement présenter une survie très longue dans les conditions qu'il a précisées, mais encore constituer un réactif biologique très sûr vis-à-vis de divers poisons. Cet organe, dépourvu de tout élément nerveux, a permis ultérieurement d'effectuer de nombreuses recherches pharmacologiques (BINET, 9; DUBUISSON, 45; BOYER et CARDOT, 28; CAHEN, 25) (1).

(1) L'étude théorique du cardioréglage a fait l'objet d'une récente monographie (38).

En ce qui concerne les cardiotoniques et du point de vue qualitatif, cet organe a permis d'effectuer l'étude de l'action de divers glucosides (VITA, 147 ; BEAUNE, 6 ; BEAUNE et BALACEANU, 7). Il restait à transformer cette méthode en méthode quantitative, comme l'avaient fait, en utilisant un autre principe, pour le cœur de grenouille, ROTHLIN et OLIARO (124). A cet effet deux moyens pouvaient être tentés. Le premier consistait à établir un rapport d'accroissement de tonus ou d'amplitude des battements de ventricule d'*Helix* plongés dans diverses solutions de Scille. Il présentait l'intérêt d'utiliser comme test un effet physiologique et non toxique. Pratiquée par TREVAN, VAN BOOK et GADDUM (144) sur l'oreillette de lapin, par TADASHI (136) sur le cœur isolé de *Rana nigra maculata*, elle s'est révélée inapplicable sur le ventricule d'escargot, en raison d'une sensibilité très inconstante d'un même organe vis-à-vis d'une même dose de Scille, et des divergences de réactivité des différents ventricules vis-à-vis d'une même dose de Scille. Devant les échecs rencontrés dans l'application de cette méthode, nous nous sommes attaché à en mettre au point une seconde. Celle-ci, basée sur le principe de TREVAN, consiste à déterminer les pourcentages de cœurs arrêtés par une même dose de Scille. Ainsi, les différences de réactivité constituent le principe même de cette méthode de dosage de la Scille.

Pour effectuer ces recherches, nous avons suivi la technique physiologique d'isolement et de montage du ventricule d'*Helix* qui, mise au point par CARDOT, est d'exécution très simple.

A l'aide de cette technique, nous avons cherché à procéder au dosage biologique de la Scille et, à cet effet, à établir la courbe de toxicité en fonction des doses de poison. Cette courbe nous a permis le do-

sage des poudres déjà essayées par les autres méthodes.

Ce chapitre comprend trois parties : l'exposé des conditions expérimentales et de l'établissement de la courbe d'action, le dosage des poudres de Scille, enfin la comparaison des infusés aqueux et des teintures alcooliques préparées à partir de ces poudres.

§ 1. — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

En ce qui concerne la méthode physiologique, nous avons suivi pour l'isolement et l'expérimentation sur le ventricule d'*Helix* la technique du Professeur CARDOT et nous nous sommes efforcé de la transformer en méthode quantitative. En ce qui concerne le mode d'épuisement optimum de la Scille pour la préparation du soluté destiné à l'essai sur le cœur isolé d'*Helix*, des essais systématiques ont été nécessaires.

Dans les méthodes précédentes, quelle que puisse être la supériorité d'une préparation aqueuse sur une colature alcoolique, la nature du véhicule était indifférente et n'empêchait pas le dosage. Au contraire il était permis de penser que l'essai sur le ventricule d'*Helix*, organe isolé, nécessiterait le choix d'une liqueur de nature particulière et bien déterminée. Cette hypothèse relevait en effet de deux faits contradictoires signalés par des précédents auteurs, à savoir d'une part la grande résistance de l'escargot aux cardiotoniques (A. J. CLARK, 35), d'autre part la grande sensibilité pour l'alcool des cœurs d'autres poikilothermes, comme la grenouille (MARSIGLIA, 105; RADNAÏ, 120; SANTESSON, 125; TOYOSHIMA, 142; TAKAHASKI, 137). Ces deux faits, s'ils se confirmaient pour le ventricule isolé d'*Helix*, risquaient de rendre impraticable l'essai d'une teinture aussi concentrée en alcool et d'un Infusé aussi dilué que ceux utilisés dans les méthodes précédentes.

Nous avons donc examiné successivement la méthode de dosage biologique et la méthode de préparation de soluté destiné à l'essai sur le cœur isolé d'*Helix*.

1° MÉTHODE DE DOSAGE BIOLOGIQUE

La technique de suspension du cœur isolé d'*Helix* suivie pour le dosage est la technique originale du Professeur CARDOT décrite en détail par GAUTRELET que nous nous bornerons à résumer très brièvement.

A. — TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Détaché de ses connections vasculaires avec toutes les précautions indiquées, le ventricule est placé dans un liquide de Ringer spécial. Un petit cardiographe très simple est constitué d'un manchon de verre dont l'une des extrémités est fermée par un liège sur lequel est fixé un crochet d'argent. La ligature auriculo-ventriculaire, qui comporte une anse, est engagée dans ce crochet. Une fois le bouchon bien fixé, le cardiographe est renversé et rempli de 9 cm³ de liquide de Ringer porté à une température de 22°. On fixe alors, au moyen d'une goutte de cire, l'extrémité du fil ligaturant le ventricule dans sa partie aortique, à une paille mobile placée sur un support indépendant. Les battements ventriculaires reprennent aussitôt, rapides, pour redevenir normaux dans les cinq minutes qui suivent. Le cœur est alors apte aux essais médicamenteux. C'est du moins ainsi que nous avons opéré pour l'essai de nos teintures. Dans l'essai des infusés, la nécessité d'un siphonnage complet nous a fait préférer la plongée directe du ventricule dans le produit toxique, sans bain préalable dans un Ringer normal. Grâce à un papier parchemin fixé à l'extrémité de la paille, les mouvements du cœur peuvent être facilement enregistrés.

A l'aide de cette technique nous nous proposons de comparer, sur un même ventricule d'*Helix*, l'ac-

tion tonique ou toxique d'une préparation de titre inconnu à celle de l'étalon ⁽¹⁾. Une telle méthode s'est révélée impraticable, car des expériences préliminaires nous ont permis de constater qu'une même dose de Scillarène ⁽²⁾ ou de Teinture de Scille exerce des effets différents en action et en durée, d'une part sur un même ventricule, d'autre part, sur divers organes utilisés dans les mêmes conditions et provenant d'un même lot d'animaux. A titre d'exemple nous indiquons, dans le tableau suivant, la durée de survie d'un certain nombre de ventricules isolés d'*Helix*, immergés dans un liquide de RINGER contenant une même dose de Scille ou même de Scillarène.

TABLEAU 19. — *Durée de survie des ventricules isolés d'Helix immergés dans une solution de même concentration.*

Nature de la solution	Nombre de cc de solution	Durée de survie des ventricules (min.)
Scillarène à 1 p. 1.000.	0,4	5, 5, 10, 5, 25, 20, 75, 70, 80, 10, 30, 5, 20, 5, 50, 5, 5, 5, 15, 40.
Teinture n° 3	0,35	27, 17, 10, 37, 15, 8, 34, 45, 30, 36, 15, 10, 10, 10, 30, 20, 15.
Teinture n° 2	0,35	10, 15, 10, 25, 20, 35, 35, 15, 10, 55.
Teinture n° 1	0,35	20, 15, 40, 25, 45, 40, 15, 10, 20, 15.

On voit dans ce tableau que la durée de survie des ventricules isolés d'*Helix* peut varier de 5 à 80 minutes pour une même dose de produit.

(1) Dans une première phase la Scille produit une forte augmentation de tons sur le ventricule d'*Helix*. Ce phénomène a déjà été observé par DE BOER sur le cœur de Grenouille.

(2) Ce phénomène qui pourrait se rapprocher des observations de BAUER avec la Strophantine sur le cœur *in situ* de Mammifère, tient peut-être à la présence de l'alcool. Nous nous proposons de revenir sur ce point dans des études ultérieures.

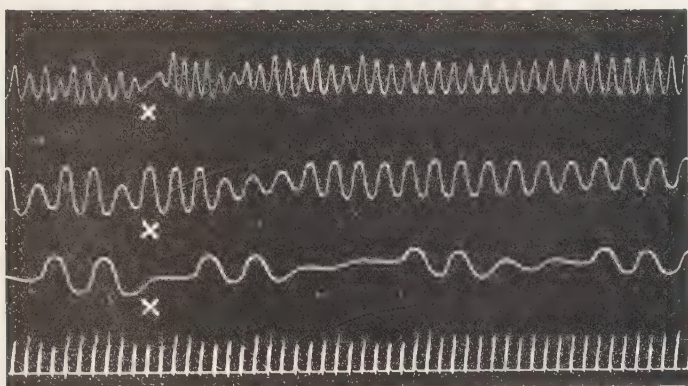


FIG. 1. — *Ventriple isolé d'Escargot.*

De haut en bas : Ligne 1 tracé ventriculaire, lignes 2 et 3 même ventricule après 7 et 14 minutes.

En X, on remplace le liquide nourricier par un Ringer renfermant 1 p. 60.000 de Scillarène A. On laisse agir 2 minutes. On élimine le liquide toxique, lave 4 fois avec du Ringer normal, et, 7 minutes après la première, on fait une seconde addition de Scillarène ; on notera une sensibilisation, à la 3^e addition, le cœur s'arrête en systole. L'action est irréversible.

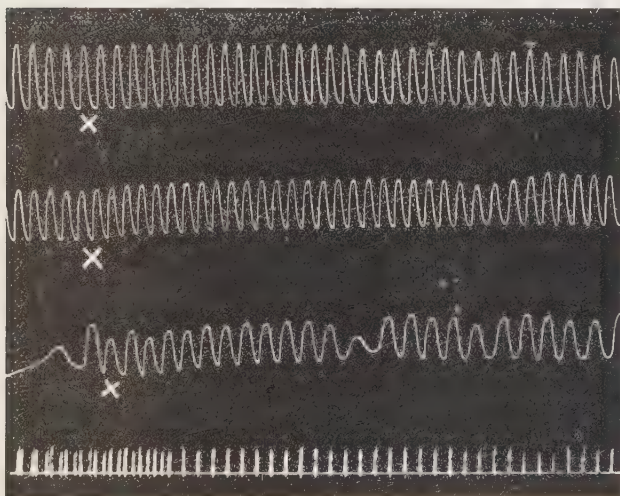


FIG. 2. — *Ventricule isolé d'Escargot.*

De haut en bas : Ligne 1, tracé ventriculaire ; lignes 2, 3, même ventricule après 7, 14 minutes.

En X, on remplace le liquide nourricier par un Ringer renfermant 1 p. 60.000 de Scillarène A. On laisse agir 2 minutes, on élimine le liquide toxique, lave 4 fois avec du Ringer normal et, 7 minutes après la première, on fait une seconde addition de Scillarène. On notera, par comparaison avec la fig. 1, une résistance bien plus grande de ce ventricule. Après 6 additions successives l'arrêt n'est pas instantané.

Nous donnons aussi, à titre d'exemple, dans les figures précédentes (fig. 1 et 2), la représentation graphique de l'action d'une même dose de Scille répétée après des écarts de temps égaux et des lavages effectués dans des conditions strictement identiques.

Ainsi le ventricule d'*Helix* semble présenter une divergence de réactivité individuelle vis-à-vis de la Scille; aussi avons-nous songé à utiliser cette différence de sensibilité des divers organes pour en faire le principe d'une méthode statistique. Nous nous sommes proposé de déterminer le nombre d'organes arrêtés par une dose donnée de Scille et de construire la courbe exprimant les variations de toxicité en fonction des doses.

B. — ÉTABLISSEMENT D'UNE COURBE D'ACTIVITÉ

Pour établir la courbe d'activité nécessaire à la pratique d'un dosage, nous avons choisi l'Infusé à 1 p. 200 de la poudre N° 2, concentré ultérieurement jusqu'au 1/4 de son volume initial. Quatre pourcentages différents ont été déterminés, chacun sur vingt cœurs isolés, le test adopté étant l'arrêt des organes (constaté sans enregistrement après 45 minutes). Les résultats obtenus figurent dans le tableau suivant.

TABLEAU 20. — *Toxicité sur le ventricule isolé d'Helix pomatia de diverses dilutions d'Infusé de Scille.*

Nombre de mg. de Scille	Nombre de cc. d'infuse concentré par 9 cc de solution	Pourcentage d'arrêt de ventricules
180	9 c.	95
140	7 c.	55
120	6 c.	40
80	4 c.	10

La courbe d'activité a été construite de la façon suivante. En ordonnées, nous avons fait figurer les pourcentages de ventricules arrêtés en 45 minutes ; en abscisse, la concentration en Infusé du liquide contenu dans le cardiographe.

En effet, pour la simplicité des calculs, nous avons représenté les résultats non pas en doses de Poudre, mais en nombre de centimètres cubes d'Infusé au 1 p. 50 dilué dans le volume total de 9 cc. dans lequel baigne le ventricule. La courbe est représentée dans la figure suivante (fig. 3).

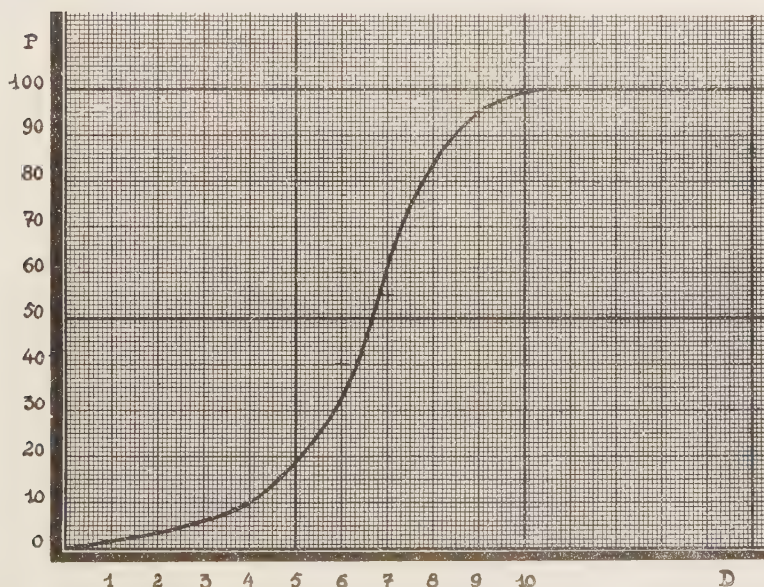


FIG. 3. — Courbe dite de toxicité sur le ventricule isolé d'*Helix Pomatia*.

En abscisses doses croissantes d'infuse de Scille à 1 p. 200 concentré au quart de son volume.

En ordonnées pourcentages d'arrêts de ventricule correspondant.

La courbe obtenue est une courbe en S, en « doucine », de même forme que celle de SHACKELL (126) et très semblable aux diverses courbes de toxicité (TREVAN, 143) ou d'action médicamenteuse (œstrogène : COWARD et BURN, 40; émétique : BURN, 19).

2° MÉTHODE DE PRÉPARATION DU SOLUTE DESTINÉ A L'ESSAI PHYSIOLOGIQUE

Nous avons examiné, d'une part, le rôle que pouvait jouer l'alcool sur le cœur isolé d'*Helix*, d'autre part, le choix du mode de préparation optimum de la Scille en vue de son essai physiologique.

A. — INFLUENCE DE LA NATURE DU VÉHICULE

Afin de rechercher si l'alcool exerçait une action toxique sur le cœur isolé d'*Helix*, deux séries d'expériences ont été effectuées.

La première a porté sur des teintures de toxicité essentiellement différentes en même temps que sur une solution alcoolique de Scillarène A au 1 p. 1000 et de l'alcool à 60°.

Le titre alcoolique de ces quatre teintures et de la solution de Scillarène était également de 60°. Le titre alcoolique de 0 cc. 4 de chacun de ces solutés amené à un volume de 9 cc. par dilution dans du liquide de RINGER, était de 2°66 environ. Nous avons déterminé les pourcentages de ventricules arrêtés par immersion dans ces solutions et les résultats obtenus figurent au tableau suivant.

TABLEAU 21. — *Pourcentages comparés d'arrêts de ventricules d'Helix pomatia (teintures non évaporées).*

Nature de la solution	Scillarène 1 p. 100	Teint. 2	Teint. 3	Teint 1	Teint. 4	Alcool à 60°
Pourcentage d'arrêt de ventricules ...	80	80	75	80	75	70

Essais effectués sur 0 cc. 5 additionné de Liquide de Ringer

On voit, d'après ce tableau, que toutes ces solutions, de nature différente mais de même titre alcoolique, produisent le même pourcentage d'arrêts de ventricules isolés.

Tous ces produits, de même titre alcoolique, présentent la même toxicité. L'alcool semble donc le seul responsable de la mortalité.

Nous avons contrôlé d'ailleurs ce rôle toxique de l'alcool dans une deuxième série d'expériences où nous avons enregistré les différentes phases de l'empoisonnement. Dans un Ringer titrant 2 à 3° d'alcool, on note une augmentation immédiate et considérable du tonus ventriculaire. En quelques secondes, le ventricule s'arrête en systole. L'action est reversible, car

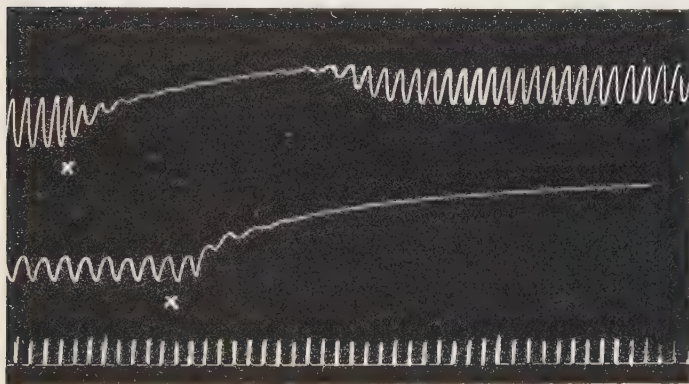


FIG. 4. — *Ventricule isolé d'Escargot.*

De haut en bas : Ligne 1, tracé ventriculaire ; ligne 2, même ventricule après 20 minutes ; en X on remplace le liquide de Ringer normal par du liquide de Ringer titrant 2°6, d'alcool éthylique, en l, on élimine le liquide de Ringer alcoolisé, on lave à deux reprises et on laisse le ventricule au contact de liquide de Ringer normal. On notera une sensibilisation. A la seconde addition, l'arrêt est irréversible.

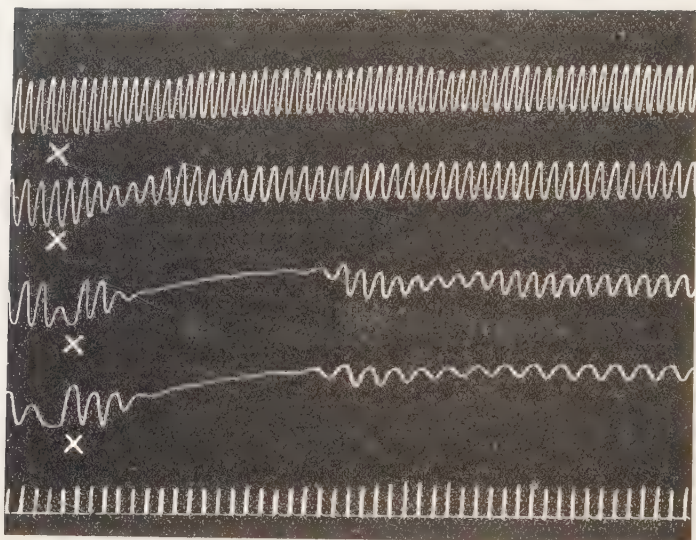


FIG. 4 bis. — Ventricle isolé d'Escargot.

De haut en bas : Ligne 1, tracé ventriculaire; ligne 2, 3 et 4, même ventricule après 5, 10 et 20 minutes.

En X on remplace le liquide de Ringer normal par du liquide de Ringer titrant 2°6, d'alcool éthylique; en I, on élimine le liquide de Ringer alcoolisé, on lave à deux reprises, et on laisse le ventricule au contact de liquide de Ringer normal. On notera par comparaison à la fig. 4 une résistance particulière de ce ventricule vis-à-vis de l'alcool.

le lavage fait reprendre les battements, mais il y a sensibilisation, et après 2 ou 3 additions, l'arrêt devient définitif. Nous donnons à titre d'exemple la représentation graphique de ce phénomène dans la figure précédente (fig. 4 et 4 bis). Au contraire, comme on le constate dans le graphique suivant (fig. 5) une solution alcoolique très diluée, titrant 0°5, est sensiblement sans action. Ainsi la toxicité de l'alcool pour le ventricule isolé d'*Helix* est certaine. Ce fait interdit de doser une teinture de Scille sans élimination préalable de l'alcool, la toxicité de l'alcool de cette teinture dépassant celle des principes actifs dissous.

B. — CHOIX DU MODE DE PRÉPARATION OPTIMUM DU LIQUIDE DESTINÉ A L'ESSAI SUR LE VENTRICULE D'HELIX

L'action toxique de l'alcool sur le ventricule d'*Helix* nous obligeait soit à l'éliminer par évaporation pour permettre d'utiliser une teinture de Scille, soit à n'employer que des préparations aqueuses. Aussi, afin de déterminer le mode de préparation optimum d'un liquide destiné à l'essai biologique, nous avons comparé l'action de teintures évaporées et d'infusés aqueux.

a) *Essai de teintures évaporées.* — Nous avons déjà exposé, à la description de la technique expérimentale, l'essai effectué avec ces produits. Privées

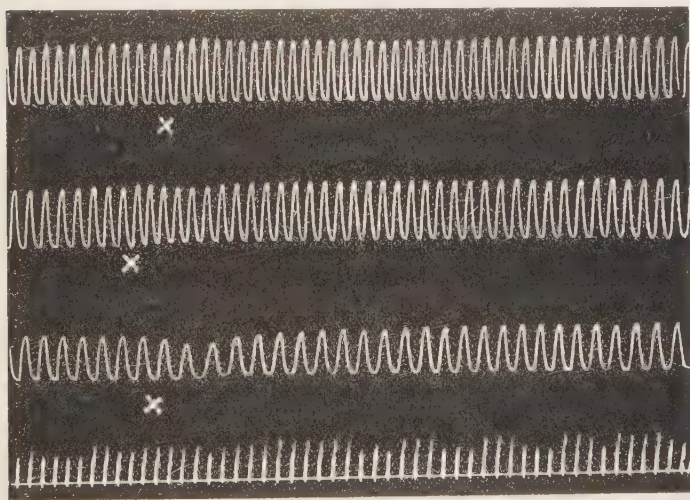


FIG. 5. — Ventricule isolé d'Escargot.

De haut en bas : Ligne 1, tracé ventriculaire; ligne 2, même ventriculaire après cinq minutes; ligne 3, même ventricule après dix minutes.

En X on remplace le liquide de Ringer par un liquide de Ringer contenant 0,5 p. 100 d'alcool éthylique; en 1, on élimine le liquide de Ringer alcoolisé, et on lave à deux reprises avec du liquide de Ringer normal. On notera l'absence d'effet toxique (alcool 0°5).

par évaporation de presque tout leur alcool ⁽¹⁾, elles deviennent beaucoup moins toxiques pour le cœur isolé d'*Helix*. Il faut 2 cc. de teinture évaporée pour produire un pourcentage d'arrêts analogue à 0 cc. 4 d'une teinture pure. Mais administrées à la même dose ces diverses teintures ne produisent pas les mêmes effets. Les pourcentages d'arrêts obtenus sont proportionnels à l'activité des teintures, déterminée par les autres méthodes décrites. Ces résultats paraissaient donc *a priori* satisfaisants. Toutefois cette technique présentait deux inconvénients : en premier lieu l'insolubilisation de produits divers au cours de l'évaporation, en second lieu la possibilité de l'altération des principes actifs ou activants au cours de l'évaporation.

Dans ces conditions nous avons préféré chercher s'il était possible d'effectuer l'épuisement de la drogue par Infusion aqueuse.

b) *Essais des Infusés aqueux.* — Comme le permettait de le supposer sa résistance vis-à-vis d'une teinture privée d'alcool, le ventricule d'*Helix* s'est également montré très résistant vis-à-vis des Infusés de Scille. Plongé dans un infusé à 1 p. 200, additionné des sels indiqués dans la formule de la liqueur de RINGER, il survit presque aussi longtemps que dans une liqueur de RINGER pure. Essayé dans les mêmes conditions, un Infusé à 1 p. 75 ne se montre pas plus actif. Cependant, une telle concentration risque de n'épuiser que partiellement la drogue et fournit un Infusé très mucilagineux dont la filtration, même dans le vide, est difficile et lente. C'est pourquoi nous avons préféré opérer sur un liquide concentré par évaporation. L'Infusé à 1 p. 200

(1) Le dosage de l'alcool effectué sur ces teintures évaporées par la méthode de NICLOUX a montré que le titre alcoolique ne dépasse pas 3°.

est évaporé jusqu'au quart de son volume primitif et additionné de divers sels. Le produit obtenu est limpide et titre 1 p. 50 de son poids de Poudre de Scille. Dans un tel Infusé préparé à partir de la poudre n° 2, 95 p. 100 des ventricules d'*Helix* cessent de battre dans le temps fixé. Pour ceux des autres poudres, le pourcentage est inférieur et varie dans l'ordre de leur activité. La plus grande rapidité de préparation de l'Infusé aqueux nous conduit à adopter ce mode d'épuisement pour doser la Scille par la méthode utilisant le cœur isolé d'*Helix*.

§ 2. — ESSAIS EFFECTUÉS

Les diverses recherches précédentes sur la méthode de dosage physiologique et la méthode d'extraction de la Scille en vue de l'essai physiologique nous ont permis d'effectuer le dosage de diverses poudres de Scille en comparant d'après la courbe de toxicité, leur activité à celle d'un étalon. Ce dosage a été effectué principalement sur les infusés aqueux. Pour les préparations alcooliques, il ne nous a pas été possible, faute de matériel, de construire la courbe d'action. Nous nous sommes donc borné à comparer les effets de quatre teintures de Scille différentes administrées à la même dose.

1° PRÉPARATION AQUEUSE

Nous avons dosé par cette méthode les poudres n°s 1, 3 et 4. De chacune de ces poudres il a été préparé un Infusé à 1 p. 200 concentré ensuite dans les conditions indiquées. Chaque Infusé obtenu est administré à 20 cœurs isolés, à une dose telle que le

pourcentage de mortalité se trouve entre 40 et 80 p. 100, c'est-à-dire dans la zone optimum d'une courbe d'activité médicamenteuse. 20 autres ventricules prélevés sur le même lot dans les mêmes conditions physiologiques sont plongés dans une quantité voisine d'un Infusé de Poudre étalon. Puisque la partie de la courbe qui est caractéristique est celle qui est voisine de 50 p. 100, nous avons cherché à effectuer la majorité des expériences à des doses actives dans ces conditions.

Pour tous ces essais, nous avons employé des Infusés non dilués. Le tableau suivant groupe les pourcentages de mortalité obtenus, et les valeurs comparées de chacune des poudres, calculées d'après la courbe d'activité.

TABLEAU 22. — *Pourcentage d'arrêt fournis par différentes poudres et valeurs comparées de ces poudres (épuisement obtenu par concentration à 1 p. 50 d'un infusé à 1 p. 200).*

N ^o des poudres	Pourcentage de mortalité	Valeur comparée des poudres
2	95	100
1	60	77
3	35	63,8
4	15	50

2° PRÉPARATIONS ALCOOLIQUES

Nous avons étudié l'action des Teintures alcooliques évaporées jusqu'à moitié de leur volume primitif suivant la technique du Codex Anglais pour l'essai physiologique des Teintures de Digitale et ramenées au volume primitif à l'aide de liquide de

Ringer ; chaque pourcentage a été déterminé en ajoutant 2 cm³ d'un tel produit aux 9 cm³ de Ringer contenus dans le cardiographe. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant.

TABLEAU 23. — *Toxicité sur le ventricule isolé d'Helix pomatia de diverses dilutions de Teintures de Scille.*

N ^o des Teintures	1	2	3	4
Pourcentages d'arrêts de ventricules d'Hélix	100	100	95	45

Ces résultats ne s'écartent que faiblement de ceux obtenus par les méthodes précédentes plus longues et plus coûteuses.

§ 3. — ACTIVITÉ COMPARÉE DES PRÉPARATIONS AQUEUSES ET ALCOOLIQUES

Un dernier point restait cependant à établir : le rapport d'activité existant entre les préparations aqueuses et les préparations alcooliques par la méthode des ventricules isolés d'escargot.

La comparaison des résultats obtenus est consignée dans le tableau suivant où nous donnons la valeur 100 à l'infusé à 1 p. 200.

TABLEAU 24. — Valeurs comparées des préparations aqueuses et alcooliques par la méthode statistique de toxicité sur les cœurs isolés d'*Helix*.

N ^o des Poudres	Nature de l'épuisement	
	Infusé à 1 p. 200	Teinture évaporée
2	100	100
1	100	130
3	100	115
4	100	117

On voit, d'après ce tableau, que dans un cas la toxicité de l'infusé aqueux est égale à celle de la Teinture alcoolique évaporée. Dans trois autres cas elle lui est inférieure de 15 à 30 p. 100. Ces résultats s'opposent à ceux obtenus par les deux méthodes précédentes. Pour expliquer cette divergence, plusieurs hypothèses peuvent être proposées. En premier lieu cette divergence pourrait être attribuée à l'imprécision de la méthode. Mais, comme le montrera une étude critique, les écarts expérimentaux sont supérieurs à ceux de la *Standard Deviation*.

On pourrait, d'autre part, attribuer la toxicité plus grande de la teinture à la présence d'alcool. Mais le titre alcoolique d'une teinture ainsi évaporée est de 3 p. 100. Après dilution dans le RINGER, ce titre s'abaisse à 0°5 environ. Des expériences témoins nous ont montré qu'à cette dose l'alcool n'est pas toxique pour le cœur isolé d'*Helix*. On peut donc supposer que la différence de réaction vis-à-vis de l'Infusé aqueux dans les expériences sur l'escargot, d'une part, dans les essais sur le cobaye, le lapin (perfusion), d'autre part, résulte de la différence des modes

d'administration : action directe sur le ventricule isolé dans le premier cas, action sur l'animal total, c'est-à-dire un cœur *in situ* de mammifère dans l'autre cas.

Des expériences ultérieures permettront de préciser ce point.

Ainsi les Teintures alcooliques ne peuvent être utilisées directement au dosage biologique de la Scille par la méthode statistique d'arrêts de cœurs isolés d'escargot en raison de la toxicité de l'alcool pour cet organe.

Si on veut utiliser ces préparations, il est nécessaire d'éliminer l'alcool par évaporation, ce qui amène la formation d'un précipité insoluble. Dans ces conditions, il semble préférable d'utiliser l'Infusé aqueux à 1 p. 200, concentré par évaporation jusqu'au quart de son volume initial. Ce soluté bien que moins actif, dans certains cas, que la Teinture alcoolique évaporée, donne des résultats constants.

*
* *

CONCLUSIONS

1) Une méthode statistique concernant le phénomène de toxicité sur le ventricule isolé d'*Helix pomatia* et consistant à déterminer le pourcentage d'organes arrêtés par la Scille, a été mise au point pour le dosage biologique de cette drogue.

2) Les solutes extractifs de Scille, convenables pour l'essai biologique sur le ventricule isolé d'*Helix* sont la teinture privée d'alcool par évaporation et l'Infusé à 1 p. 50 obtenu par concentration de l'Infusé à 1 p. 200.

3) Cette méthode est d'expérimentation très simple et d'un prix très économique. Comme toutes les méthodes statistiques, elle donne des résultats suffisamment rigoureux pour des doses actives sur 50 p. 100 des organes isolés.

II

MÉTHODE STATISTIQUE D'EFFETS ÉMÉTIQUES CHEZ LE PIGEON

Les premiers essais de détermination de l'activité biologique des préparations de Digitale par leur action émétique furent l'œuvre de HANZLICK (66). Cet auteur, en 1926, eut l'idée d'utiliser la sensibilité particulière du pigeon aux effets émétiques (LAUNOY) pour établir une méthode d'essai biologique de teintures de Digitale ; il proposa à cet effet de déterminer la plus petite dose active sur le pigeon ou « *unité-pigeon* », c'est-à-dire celle qui provoque le vomissement chez deux pigeons sur trois.

Cette méthode présentait le double avantage d'une exécution simple, le pigeon se prêtant bien aux injections intraveineuses, et d'un terme de réaction plus rigoureux que celles basées sur la toxicité, étant donné le parallélisme observé par HANZLICK entre les doses thérapeutiques de Digitale pour l'homme et l'unité-pigeon, définie par lui.

Mais, reprise par divers auteurs (CARRATALA, 32; GOLD, TRAVELL et KWIT, 58; SCHUNTERMANN, 127; LIEB et MULINOS, 100; HANZLICK et ses collaborateurs, 66, etc.; KROSZCZINSKI, 89), la technique d'HANZLICK fut l'objet de diverses critiques. BURN, en particulier,

montra qu'en appliquant la définition de la dose émétique donnée par HANZLICK, on obtenait des résultats très variables pour une même teinture lorsqu'on employait différents pigeons. La définition d'HANZLICK supposait une réactivité constante des animaux vis-à-vis de la Digitale, puisque dix groupes différents, comprenant chacun 3 pigeons, étaient considérés par cet auteur comme devant donner des résultats très voisins. Or, tout au contraire, les expériences de BURN ont montré que la réaction vomitive des pigeons à la Digitale n'était qu'un autre exemple des différences continuelles d'une propriété biologique.

S'appuyant alors sur les travaux de TREVAN (143), publiés en 1927, BURN proposait une technique statistique d'estimation de l'activité émétique de la Digitale. La sensibilité individuelle, qui rendait impraticable la méthode d'HANZLICK, pouvait constituer, d'après BURN, le principe même d'une méthode de dosage de la Digitale par son action émétique sur le pigeon.

En faisant varier les doses, et en notant chaque fois le nombre d'animaux qui vomissent, cet auteur établit une courbe d'action émétique de la Digitale. A condition d'injecter, à quelques jours d'intervalle, une même quantité de la teinture inconnue et de la teinture étalon, BURN obtint, par cette méthode du pigeon, des résultats aussi rigoureux qu'avec une détermination de la toxicité chez le chat et la grenouille.

Mais, depuis ces travaux, la méthode d'essai de la Digitale, par son action émétique, a été soumise à d'autres critiques.

En 1931, GOLD, TRAVELL et KWITT (58) ont remarqué que des injections prolongées de Digitale, au chien et au chat, infirmant les résultats d'HANZLICK

sur ce point, finissaient par émousser le réflexe vomitif en même temps que les symptômes toxiques cardiaques augmentaient.

S'opposant au travail de ces auteurs, LIEB et MULINOS (100) reprochaient à cette méthode l'apparition d'une hypersensibilité du réflexe vomitif, se traduisant par l'apparition d'un réflexe conditionné lorsque l'on prolongeait les injections. LIEB et MULINOS, en outre, prenaient soin d'éliminer les pigeons trop sensibles ou, au contraire, trop résistants. Cette hypersensibilité, il est vrai, pouvait tenir à la fréquence des injections répétées plusieurs fois par semaine, alors que, prenant soin d'espacer les injections de 8 jours, BURN n'observait l'apparition d'aucun réflexe conditionné.

A la suite de ces observations, c'est la technique de BURN que nous avons songé à adopter pour un dosage biologique des préparations de Scille, comparativement aux méthodes de perfusion déjà décrites. Il paraissait vraisemblable que cette technique, bien mise au point pour la Digitale, s'appliquerait également à la Scille et même que la courbe d'action serait comparable pour ces deux drogues. Cependant, étant donné la différence de sensibilité des espèces animales modifiant la forme de la courbe dans certains cas (CHOPRA et CHOWHAN, 34; BHATIA et LABB, 8), il nous a paru nécessaire de chercher à établir expérimentalement cette courbe sur deux variétés de pigeons domestiques communs en France. D'autre part, il était nécessaire d'établir, sur un grand nombre d'expériences et pour les deux variétés de pigeons étudiées, dans quelles limites la réactivité de l'animal vis-à-vis d'une même dose de Scille restait constante. Aussi nos premières recherches ont-elles dû consister à vérifier si l'administration répétée de Scille ne modifiait pas la sensibilité de l'animal. Les

résultats obtenus nous ont permis d'effectuer avec sécurité la construction de la courbe d'action émétique. Cette courbe nous a permis de doser diverses préparations aqueuses et alcooliques de Scille par rapport à l'étalon. Dans le chapitre qui va suivre nous envisageons successivement ces différents points.

*
* *

§ 1. — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Nous décrirons successivement la technique expérimentale, la vérification de la constance de réactivité du pigeon, l'établissement des courbes d'action émétique, enfin l'estimation de l'activité de la Scille d'après ces courbes.

1° TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

La technique suivie dans ces recherches est très simple et se rapproche de celle décrite par BURN. Sans entrer dans le détail, nous nous bornerons à résumer très brièvement les précautions suivies :

A. — *Race*. — Nous avons utilisé deux lots de 23 pigeons chacun, mais de races différentes, les lots sont désignés dans ce travail sous le nom de lot 1 et de lot 2 ⁽¹⁾.

B. — *Poids*. — Pour chacun de ces lots, le poids des animaux variait de 250 à 500 grammes.

C. — *Sexe*. — Nous avons utilisé indifféremment des animaux des deux sexes.

(1) Les pigeons ayant servi à nos expériences étaient des pigeons domestiques vulgaires des races *Bizet* et *Messenger* (sous-race *Voyageur*). Nous tenons à remercier le Laboratoire d'Ethologie des Animaux Sauvages du Museum (Pr. URBAIN) qui a bien voulu se charger de cette détermination.

D. — *Fréquence ou répétition des injections.* — L'injection était faite une fois par semaine, à 7 jours d'intervalle au moins, avec une semaine de repos de temps en temps.

E. — *Préparation des animaux.* — Dix-huit heures avant l'expérience, tous les animaux étaient privés de nourriture et d'eau.

F. — *Modalités de l'injection.* — Chaque pigeon recevait une dose de teinture ou d'infusé de Scille proportionnelle à son poids ; les teintures étaient diluées au 1/10 dans du sérum physiologique à 8 p. 1.000, les infusés administrés directement. Cette injection était pratiquée dans la veine antibrachiale ou brachiale (LACOMBE, 90), à l'aide d'une aiguille courte (longueur : 1 cm.) et fine (diamètre : 0 mm. 5).

Afin d'éviter l'erreur de mensuration de volume du liquide injectable, la même seringue de 0 cc. 5 et graduée au 1/100, étalonnée par nous-même, nous a servi pour toutes les injections. Aussitôt après la piqûre, les pigeons étaient répartis dans des cages par groupes de 4 à 5. L'observation durait une heure ; on considérait comme réaction positive, non seulement un vomissement mais des efforts de nausée et l'animal était aussitôt écarté. Les mouvements que présente le pigeon dans ces efforts ne peuvent prêter au doute. Ils sont presque toujours précédés du hérissement des plumes et de légers tremblements. Brusquement, l'animal projette la tête en avant, et son bec vient souvent frapper le plancher de la cage, tandis que ses ailes s'écartent légèrement du corps, il présente trois ou quatre convulsions successives, et, il est rare que d'autres ne leur succèdent après un intervalle de quelques minutes.

2° CONSTANCE DE RÉACTIVITÉ DU PIGEON A LA SCILLE AU COURS D'UNE EXPÉRI- MENTATION PROLONGÉE.

A. — *ÉTAT PHYSIOLOGIQUE.* — Les animaux sont conservés pendant toute la durée de l'expérimenta-

tion dans les conditions physiologiques les meilleures et dans un pigeonnier vaste et ensoleillé. Pendant toute la durée de nos expériences nous avons noté avec soin, toutes les semaines, le poids de nos animaux, et, dans ces conditions, nous avons constaté qu'il augmentait légèrement ou demeurait stationnaire. Les animaux semblent donc rester suffisamment comparables à eux-mêmes. De plus, afin d'éviter les accidents d'avitaminose, en particulier le beri-beri, qui, d'après MÉHÈS (109), augmente la résistance du pigeon aux effets émétiques des Digitaliques, nous avons soumis les animaux à un régime riche en vitamines, sous forme de blé germé, levure de bière, son additionné d'huile de foie de morue.

B. — RÉACTIVITÉ DE L'ANIMAL VIS-A-VIS DE LA SCILLE.
— Nous avons examiné successivement les variations individuelles des pigeons et leur constance de réactivité vis-à-vis d'une même dose de Scille au cours d'une administration prolongée.

a) *Variations individuelles.*

Le pigeon qui, une certaine semaine, est sensible à une faible dose, résiste souvent la semaine suivante à une même dose ou à une dose plus élevée. Au contraire, le pigeon qui ne réagit pas une semaine à une forte dose peut être sensible la semaine suivante à une très faible dose. Ce fait vient encore infirmer la théorie de l'unité-pigeon d'HANZLICK. Par contre, il semble que, dans un lot aussi important que ceux sur lesquels nous avons opéré, des équilibres se fassent qui empêchent l'apparition de ces brusques changements de sensibilité individuelle dans le pourcentage final.

b) *Réactivité de l'animal pour une même dose de Scille au cours d'une administration prolongée.*

La contradiction des résultats publiés par les auteurs sur la réactivité du pigeon à des injections répétées de Digitale nous a incité à vérifier, avant d'établir la courbe

d'action émétique des teintures de Scille, si une administration répétée, pendant plusieurs mois, ne provoque ni l'apparition d'un réflexe conditionné, ni celle d'une hypersensibilité ou d'une hyposensibilité aux effets émétiques de la Scille.

a. — *Réflexe conditionné.* — LIEB et MULINOS ont critiqué dans la méthode d'HANZLICK la possibilité, si l'on répète les injections tous les 2 ou 3 jours, de provoquer l'apparition d'un réflexe conditionné se traduisant par des vomissements à la seule vue de l'opérateur, ou à la suite d'une injection. Au cours de nos expériences prolongées pendant 6 mois, nous n'avons jamais noté un tel réflexe à condition d'espacer les injections de 7 jours. D'autre part, nous avons examiné systématiquement la réactivité de nos animaux, vis-à-vis d'injection de sérum physiologique. Avant toute administration de Scille, l'injection intra-veineuse de sérum physiologique ne provoquait aucune réaction dans le premier lot, tandis que, dans le second, quatre pigeons sur 23 présentaient une réaction positive⁽¹⁾. Par la suite, prenant la précaution indiquée par BURN *de ne pratiquer l'injection de Scille qu'une fois par semaine*, nous avons, après 1, 2, 4 et 6 mois, pour le premier lot, puis 1, 2, 3 et 4 mois pour le second lot, renouvelé l'administration intra-veineuse de sérum. Cette injection était alors pratiquée 8 jours après la dernière dose de Scille. A la plus récente injection, comme le montre le tableau suivant, nous avons noté deux pigeons qui ont vomi, dans le premier lot, et 4 dans le second, en tout six animaux, alors qu'avant toute administration de Scille, cinq étaient déjà sensibles au sérum physiologique. Il semble donc que, dans les conditions où nous avons opéré, il ne se produise pas de réflexe conditionné.

(1) Le Professeur LAUNOY a déjà signalé, pour le Pigeon, l'effet émétique dû à l'injection de sérum physiologique.

TABLEAU 25. — *Nombre d'animaux qui vomissent à la suite d'une injection de sérum physiologique (après une administration de Scille régulière et plus ou moins prolongée).*

Premier lot		Deuxième lot	
Ecart de temps avec la première injection de Scille	Nombre de pigeons qui vomissent sur 23	Ecart de temps avec la première injection de Scille	Nombre de pigeons qui vomissent
15 jours	0	8 jours	5
1 mois	0	2 mois	4
4 mois	2	4 mois	

β. — *Phénomènes d'hypo ou hypersensibilité à la Scille.* — L'administration répétée de Scille provoque-t-elle une hypersensibilité sans réflexe conditionné ou, au contraire, une hyposensibilité du pigeon vis-à-vis de l'action émétique de cette drogue ? En 1931, GOLD TRAVELL et KWITT (58) constataient que des doses émétisantes répétées de Digitale émoussaient, chez le chien et le chat, le centre du vomissement, tandis que, en même temps, les symptômes d'intoxication cardiaque augmentaient, à la suite de l'accumulation. Les animaux finissaient par mourir d'intoxication digitalique sans que les vomissements du début reprennent. Ces auteurs concluaient que le réflexe du vomissement ne pouvait être pris pour mesure de l'action cardiotonique des Digitaliques. Mais la même année, HANZLICK, s'appuyant sur ses recherches personnelles, celles de BURN et de quelques auteurs ayant emprunté sa méthode, répondait à cette critique de GOLD en notant qu'il n'avait jamais observé sur le pigeon semblables phénomènes. Pour en vérifier nous-mêmes l'absence à la suite d'injections prolongées de Scille, nous avons pris soin de répéter deux fois la même dose, à des intervalles

de temps variés. Sans entrer dans le détail nous nous bornerons à consigner les résultats de nos expériences dans le tableau qui suit.

TABLEAU 26. — *Pourcentages de vomissement produits par une même dose de Scille répétée à des intervalles de temps variés.*

1 ^{er} LOT			Intervalle de temps entre les deux injections (jours)	2 ^e LOT			Intervalle de temps entre les deux injections (jours)
Dose d'une même teinture (cm ³)	Pourcentage d'ani- maux vomissant			Dose d'une même teinture (cm ³)	Pourcentage d'ani- maux vomissant		
	1 ^{re} injection	2 ^e injection			1 ^{re} injection	2 ^e injection	
0,07	62,5	50	8	0,075	84	87,5	8
0,065	47,8	41,6	15	0,065	61	152	15
0,09	87,5	91,6	8	0,06	56	36	30
0,075	70	70	30	0,07	68	76	60
0,08	83	79	60				

Le faible écart de ces chiffres, qui ne sort pas du domaine des erreurs expérimentales normales, nous montre bien qu'en espaçant d'une semaine les injections, les phénomènes d'émoussement du réflexe vomitif n'entrent pas en jeu. Ainsi, à condition de pratiquer l'injection de Scille une fois par semaine comme l'avait fait le Professeur BURN (19), il ne semble pas qu'il se produise une hypo ou une hypersensibilité notable.

Les résultats contraires obtenus par quelques auteurs proviennent de conditions expérimentales différentes.

3° ÉTABLISSEMENT DES COURBES D'ACTION ÉMÉTIQUE

Les faits que nous venons de déterminer expérimentalement nous ont permis d'aborder avec sécurité l'étude de la méthode de dosage biologique. Il nous a été nécessaire pour ce dosage de construire expérimentalement la courbe d'action.

Nos essais portant à la fois sur une préparation aqueuse et alcoolique, nous devons établir une courbe pour chaque type. Disposant de deux lots d'animaux, il fallait aussi une courbe pour chaque lot. Nous avons donc été amené à construire quatre courbes différentes.

Pour la courbe des préparations alcooliques, nous avons utilisé la teinture de la poudre n° 2 déjà employée sur le cobaye et sur le lapin ; nous avons injecté cette colature à dix doses différentes produisant ainsi dix pourcentages de vomissement variant entre 20 et 100 p. 100. Cinq de ces dix déterminations ont été répétées deux fois sur le premier lot et quatre l'ont été deux fois sur le deuxième lot, comme le montre le tableau précédent. Dans le tableau suivant, nous avons consigné toutes les expériences effectuées. Les doses de poudre injectées par kg. d'animal y figurent exprimées en poudre anhydre. Pour les doses répétées deux fois, le pourcentage indiqué est la moyenne des deux déterminations.

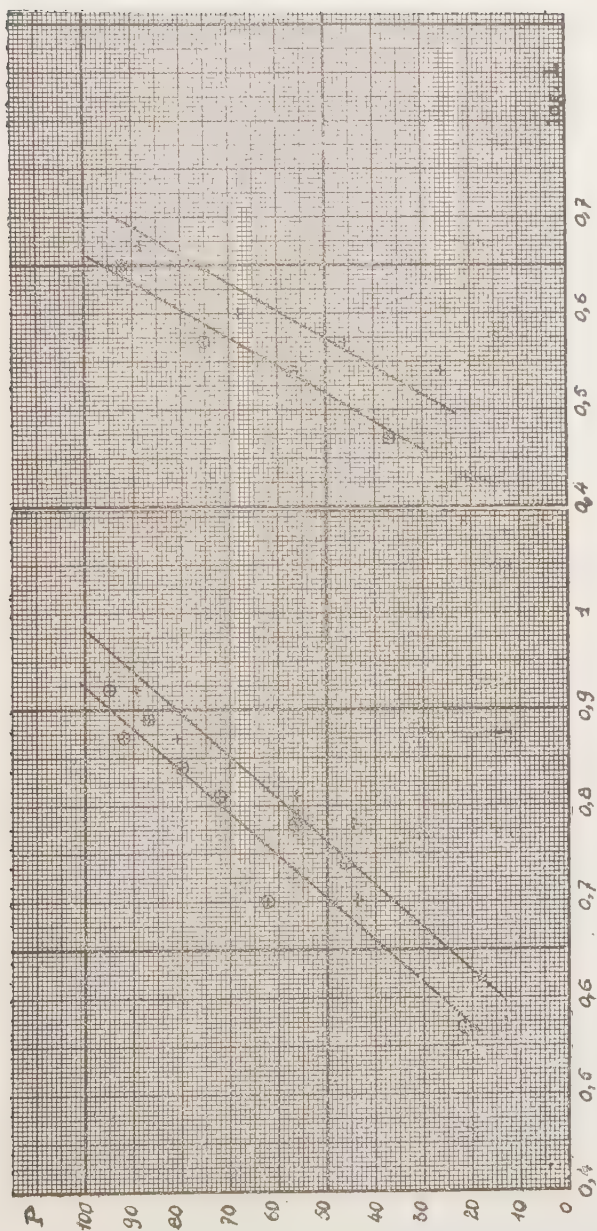
TABLEAU 27. — *Pourcentages de vomissements en fonction des doses de Teinture de Scille (Poudre 9).*

Premier lot			Deuxième lot		
Nombre de pigeons en expérience	Nombre de mgr. de poudre anhydre injectés par kg.	Pourcentage de vomissements	Nombre de pigeons en expérience	Nombre de mgr. de poudre anhydre injectés par kg.	Pourcentage de vomissements
23	4,18	17,3	23	3,72	21,7
23	5,11	43,4	25	5,11	62
23	6,04	44,7	25	5,58	46
24	6,51	56,25	24	6,04	56,5
24	6,97	70	25	6,51	72
24	7,44	81	24	6,97	85,75
24	7,90	87,5	24	7,44	92
24	8,37	89,5	24	7,90	87,5
23	8,83	100	24	8,37	95
24	9,3	100	24	8,83	95

Pour construire la courbe des Infusés aqueux, nous avons utilisé celui de la poudre 2. Quatre doses ont été injectées à chaque lot. Elles figurent au tableau 28.

TABLEAU 28. — *Pourcentages de vomissements en fonction des doses d'infusé aqueux à 1 p. 200*

Poudre anhydre (mg.)	Pourcentage de vomissement	
	Lot N° 1	Lot N° 2
3		30,7 %
3,5	26 %	57 %
3,75	46 %	75 %
4	65,3 %	92 %
4,5		
4,75	88,4 %	



Ces tableaux montrent une différence d'effets émétiques à peu près constante entre les deux lots.

Afin de voir si ces différences tenaient non pas au manque de fidélité de la méthode mais à la différence de sensibilité des espèces de pigeon utilisées, nous avons, adoptant le mode de démonstration de BURN (19), BULBRING et BURN (13), établi les variations des pourcentages de vomissement en fonction des logarithmes des doses de Scille et comparé les deux graphiques obtenus qui sont représentés dans la figure précédente (fig. 6). Celle-ci est tout à fait expressive, elle montre en effet que la droite obtenue avec le lot 1 est très approximativement parallèle à celle que donne le lot 2. Dans ces conditions il nous était permis de construire la courbe d'action émétique en prenant la moyenne des déterminations sur les deux lots, courbe susceptible de servir sur n'importe quelle espèce de pigeons.

Le même calcul a été fait pour les préparations aqueuses. Nous faisons figurer les droites exprimant les pourcentages obtenus en fonction des logarithmes des doses avec les lots 1 et 2, et la courbe représentant la moyenne des déterminations effectuées (fig. 6 *bis*).

Les deux courbes (fig. 7 et 8) sont semblables à celles qu'obtenait BURN avec la Digitale. Elles ont toutes deux la forme caractéristique des courbes en S de SCHACKELL (126) et de TREVAN (143). Elles présentent entre elles une légère différence, la courbe des Infusés aqueux fait avec l'axe des ordonnées un angle moindre en raison de leur plus grande activité.

D'autre part, il est intéressant de noter que, malgré cette similitude de nos courbes et de celle de BURN, il est possible que la Scille possède sur le pigeon une action plus fortement émétique que la Digitale. 0 cc. 3 de teinture injectés par kilog d'animal don-

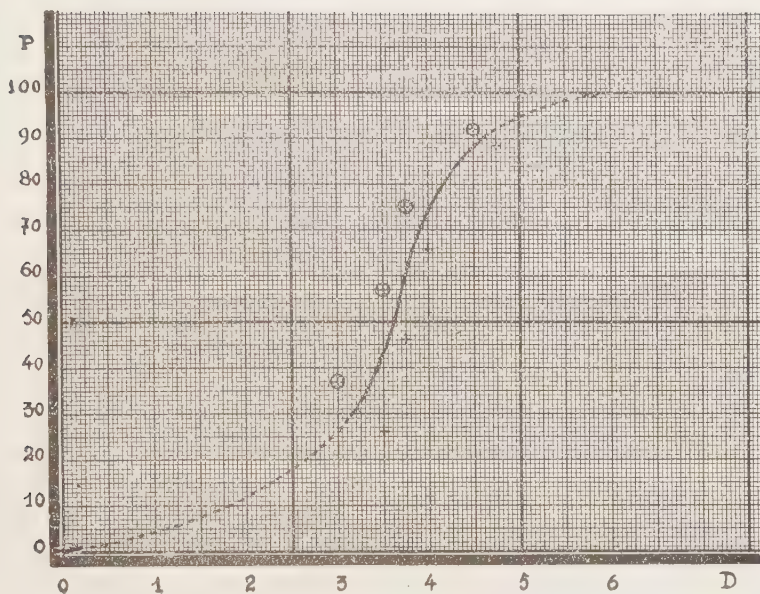


FIG. 7. — Courbe dite d'activité émétique.

En abscisses, doses croissantes d'infusés de Scille, à 1/200 dans du sérum physiologique.

En ordonnées, les pourcentages de vomissements correspondant.

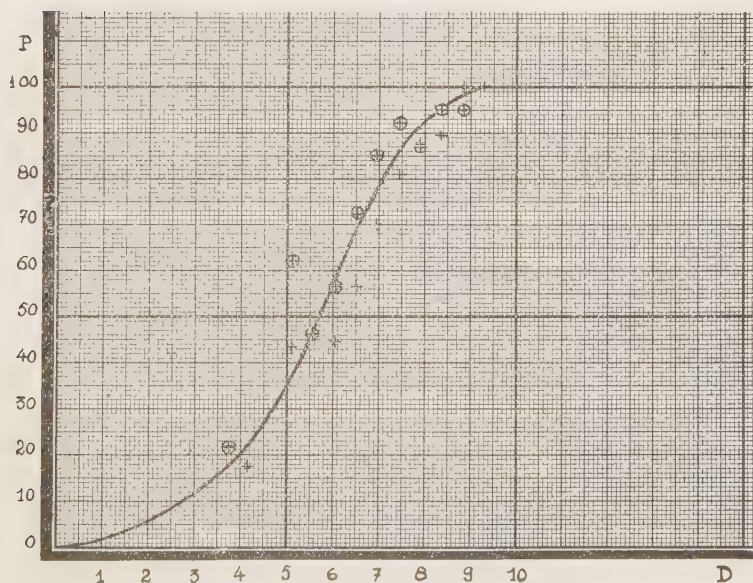


FIG. 8. — Courbe dite d'activité émétique.

En abscisses, doses croissantes de teinture de Scille, diluée à 1 p. 100 dans du sérum physiologique.

En ordonnées, les pourcentages de vomissements correspondant.

nait à BURN (19) 100 p. 100 de vomissements. Avec notre teinture de Scille, préparée par épuisement au Kumagawa avec de l'alcool à 60°, nous avons obtenu le même résultat avec une dose de 0 cc. 10 par kilog.

L'augmentation du pourcentage de vomissements, par rapport aux doses injectées, est plus rapide aussi avec la Scille qu'avec la Digitale. Tandis que, pour obtenir 100 p. 100, il faut à BURN une fois et demie au moins la dose qui produit 50 p. 100, avec notre teinture, comme avec notre Infusé, 1,35 suffit.

4° ESTIMATION DE L'ACTIVITÉ DE LA SCILLE D'APRÈS LA COURBE D'ACTIVITÉ ÉMÉTIQUE

A l'aide de ces courbes, nous avons pu doser un certain nombre de préparations de Scille. Pour cela, un même lot reçoit à plusieurs jours d'intervalle une dose de la préparation inconnue et de l'étalon. Ces doses sont choisies de telle sorte que le pourcentage de vomissements qu'elles provoquent se trouve entre 40 et 80 p. 100, c'est-à-dire dans les conditions optima de dosage. Le calcul s'effectue d'une façon très simple, comme l'indiquent les exemples suivants :

Soit 0,8 de l'Infusé de la Poudre n° 2 (étalon) qui provoque des nausées sur 65,3 p. 100 des animaux du premier lot. La même dose de l'Infusé de la poudre n° 3 ne produit les mêmes effets que sur 53 p. 100 des mêmes animaux. Si 65,3 correspond à 8 sur la courbe, 53 correspond à 7,6. Nous disons que la poudre n° 3 épuisée par double infusion est égale à $7,6 \times 100 / 8$ de poudre étalon.

Si, afin d'obtenir des pourcentages d'effet émétique voisins, il est nécessaire d'administrer aux animaux des doses différentes de Scille, le calcul s'effectue de la façon suivante :

Soit 0 cc. 7 de préparation-étalon qui provoquent des

nausées sur 40 pour 100 des animaux, 0 cc. 9 de la préparation inconnue provoquent 45 pour 100 de nausées sur le même lot d'animaux. Il suffit de rechercher d'après la courbe les abscisses correspondant à 40 et à 45 pour 100 de vomissement. Supposons que ces abscisses soient égales à 3,5 et 3,6 ; 0 cc. 9 de la préparation inconnue, épuisée dans les mêmes conditions que l'étalon, seront d'activité égale à :

$$\begin{array}{r} \text{Activité de 0 cc. 7 d'étalon} \quad 3,5 \\ \hline \text{Activité de 0 cc. 9 de teinture} \quad 3,6 \end{array}$$

Donc, 0 cc. 9 de teinture inconnue $= \frac{3,6}{3,5} \times 0,7$,

et 1 cc. $= \frac{3,6}{3,5} \times \frac{0,7}{0,9}$.

§ 2. — ESSAIS EFFECTUÉS

La méthode ci-dessus décrite nous a servi à doser quatre poudres de Scille épuisées soit par l'alcool à 60° (1), soit par infusion à 1 p. 200. Nous avons dosé une seule fois les teintures des poudres n^{os} 3 et 1 et à plusieurs reprises les Infusés des poudres n^{os} 3, 4 et 1. Le tableau suivant groupe les valeurs moyennes des diverses poudres par rapport à l'étalon pour chaque lot d'animaux et chaque mode d'épuisement.

(1) L'alcool ne semble exercer aucun effet émétique sur le Pigeon.

TABLEAU 29. — Valeurs comparées de différentes poudres, déterminées par la méthode statistique sur le pigeon.

N ^o des poudres	Colature obtenue par épuisement par l'alcool à 60°		Colature obtenue par épuisement par infusé double à 1 p. 200	
	1 ^{er} lot	2 ^e lot	1 ^{er} lot	2 ^e lot
2	100	100	100	100
1	84	95	93	97
4	59	53	62	62
3			91	91

Comparés à ceux que nous ont fourni les méthodes de perfusion sur le cobaye et le lapin, ces résultats s'en montrent très voisins. Cette méthode sur le pigeon semble fournir pour la Scille les mêmes avantages que BURN lui reconnaissait pour la Digitale.

§ 3. — ACTIVITÉ COMPARÉE DES PRÉPARATIONS AQUEUSES ET ALCOOLIQUES

Il apparaît, comme pour les méthodes précédentes, que l'Infusé aqueux à 1 p. 200 est toujours plus actif que la préparation alcoolique, les différences d'activité étant en moyenne de 40 à 50 p. 100 (tableau 30). L'infusé est donc, là encore, le mode d'épuisement de choix.

TABLEAU 30. — *Valeurs comparées de diverses préparations d'une même poudre, titrées par la méthode statistique d'effet émétique sur le pigeon.*

N ^{os} des poudres	1 ^{er} lot		2 ^e lot	
	Nature de l'épuisement		Nature de l'épuisement	
	Infusé à 1 p. 200	Teinture à 1. p. 10	Infusé à 1 p. 200	Teinture à 1 p. 10
2	100	63	100	56
2	100	57	100	53
2	100	54	100	54
2	100	57	100	59
2	100	66		
1	100	47	100	43
4	100	47	100	57

Ainsi, le meilleur mode d'épuisement pour sa commodité, sa rapidité, son activité, est l'infusé aqueux.

CONCLUSIONS

1° La méthode statistique de dosage de la Digitale basée sur ses effets émétiques (BURN) est susceptible d'être appliquée avec succès au dosage biologique de la Scille.

2° Le meilleur mode d'épuisement de la Scille pour l'essai biologique sur le pigeon est l'infusé aqueux à 1 p. 200.

3° Les résultats obtenus par cette méthode sont constants à condition d'utiliser 25 pigeons et d'injecter des doses actives sur environ 50 p. 100 des animaux. Cette méthode est économique et d'exécution simple et rapide.

DEUXIÈME PARTIE

Etude de la valeur et de la précision des diverses méthodes de dosage employées

L'examen des résultats obtenus par les quatre méthodes de dosage biologique de la Scille étudiées dans les chapitres précédents nous a permis déjà d'apprécier la constance qu'elles présentent et l'homogénéité des résultats obtenus. Il convenait d'étudier d'une façon approfondie leur précision, afin d'évaluer leurs valeurs respectives ; enfin, il était intéressant de comparer entre eux les résultats fournis par les diverses méthodes et de décider quelle méthode retenir.

Deux moyens principaux permettent de déterminer, comme on sait, la précision d'une méthode de dosage biologique. Le premier consiste à répéter un grand nombre de fois l'essai d'un même produit, dans des conditions absolument identiques. Comme le signale le Professeur BURN (14), en ce qui concerne certains dosages biologiques, on peut considérer que la dose minimum mortelle ou la dose active trouvées sont *réelles* quand le chiffre obtenu ne se modifie pas si l'on augmente le nombre des expériences. C'est là un but auquel il faut prétendre en biologie et ce procédé permet d'apprécier la grandeur des erreurs

commises. Malheureusement, la multiplication des expériences entraîne souvent une consommation d'animaux trop élevée pour que ce procédé soit utilisable dans les méthodes de perfusion lente. Nous nous sommes donc borné à l'appliquer aux méthodes statistiques.

Le second moyen de contrôler la précision de méthodes de dosage est le calcul d'erreurs. Se basant, en effet, sur les règles données par les statisticiens pour déterminer l'erreur possible, certains pharmacologues (TREVAN, 144; BURN, 14; GADDUM, 53; COWARD, 39) ont eu l'idée de les appliquer au dosage biologique. Cette méthode, qui obtint à ses débuts un vif succès, a fait, depuis, l'objet de critiques assez serrées. Il semble, en effet, difficile, comme l'a fait remarquer Raymond HAMET (64), d'appliquer aux sciences biologiques des méthodes de calcul destinées à des sciences mathématiques. Ces méthodes, en outre, ne prennent toute leur valeur que pour des grands nombres, et des raisons pratiques font qu'en biologie le champ des expériences est limité.

Nous avons pratiqué, dans la mesure où les possibilités matérielles le permettaient, la première méthode qui consiste à déterminer les écarts qui se produisent entre divers résultats expérimentaux. De plus, nous avons cru bon, ne fût-ce qu'à titre purement documentaire, de déterminer les erreurs théoriques que fournit le calcul statistique.

Nous envisagerons d'abord les erreurs obtenues expérimentalement et ensuite, nous exposerons les règles suivies par nous pour déterminer les erreurs théoriques et les résultats qu'elles nous ont fournis; enfin, dans un dernier paragraphe, nous comparerons les valeurs des différentes poudres essayées par ces diverses méthodes et déciderons quelle méthode il convient de retenir pour l'étalonnage de la Scille.

I

DÉTERMINATION DES ÉCARTS EXPÉRIMENTAUX

La méthode de détermination statistique des effets émétiques sur le pigeon qui présente l'avantage de ne pas sacrifier l'animal et la méthode statistique de toxicité sur l'escargot peu dispendieuse, nous ont permis de déterminer les écarts expérimentaux en répétant à plusieurs reprises les essais effectués sur une même dose de Scille. Nous exposerons successivement les résultats obtenus pour ces deux séries.

§ 1. — VÉRIFICATION DE LA CONSTANCE DES RÉSULTATS FOURNIS PAR LA MÉTHODE DE DÉTERMINATION STATISTIQUE DES EFFETS ÉMÉTIQUES SUR LE PIGEON

Après avoir déterminé un certain nombre de pourcentages d'action émétique, produits par différentes doses de teinture alcoolique de la poudre n° 2, nous avons répété ces déterminations dans des conditions expérimentales absolument identiques. Cinq doses ont ainsi été pratiquées deux fois sur le premier lot d'animaux et quatre doses l'ont été deux fois sur le second lot. L'examen du tableau 26 où figurent les détails de ces expériences montre que les deux pourcentages de vomissements fournis par une même dose sont le plus généralement très voisins.

De plus, puisqu'une méthode biologique est essentiellement comparative, nous avons pris soin de renouveler l'essai de différentes poudres épuisées par infusé à 1 p. 200 par rapport à la plus active d'entre elles choisie comme étalon. Ces résultats sont consignés dans le tableau suivant :

TABLEAU 31. — *Valeurs comparées de diverses poudres de Scille titrées par la méthode statistique des effets émétiques sur le pigeon (activité comparée à l'étalon = 100).*

Nos des poudres	1 ^{er} dosage	2 ^e dosage	3 ^e dosage	4 ^e dosage	Moyenne des résultats	Erreur relative pour 100 max.
1 ^{er} lot de Pigeons (lot 1)						
1	93	93			93	0
3	91	103			97	12
4	67	62	62	63	63,5	5
2 ^e lot de Pigeons (lot 2)						
1	97,5	97,5			97,5	0
3	91	92			91,5	1
4	74	62	55	61	63	19
Moyenne des erreurs maxima p. 100						5

Ce tableau montre que la différence des résultats fournis par deux dosages successifs est faible. Dans les huit essais pratiqués sur le premier lot d'animaux, une seule fois l'écart entre les résultats atteint 12 p. 100. Sur le second, elle atteint, une fois aussi, 19 p. 100, mais la moyenne de tous les écarts est bien inférieure. Elle ne dépasse pas 5 p. 100. D'autre part, les moyennes des dosages d'une même poudre sur les deux lots A et B ne diffèrent pas de plus de 5,5 p. 100.

§ 2. — VÉRIFICATION DE LA CONSTANCE DES RÉSULTATS
FOURNIS PAR LA MÉTHODE STATISTIQUE DE TOXICITÉ
SUR LE CŒUR ISOLÉ D'HELIIX

Des essais analogues, mais moins nombreux, ont été effectués en ce qui concerne la méthode statistique de toxicité sur le cœur isolé d'*Helix Pomatia*. A cet effet, nous nous sommes bornés à effectuer des dosages comparatifs, sur des échantillons de Scille épuisés à l'aide d'un infusé à 1 p. 200, concentré à 1 p. 50. Les valeurs respectives des poudres essayées à trois reprises différentes figurent dans le tableau suivant.

TABLEAU 32. — Valeurs comparées de diverses poudres de Scille titrées par la méthode statistique de toxicité sur le cœur isolé d'*Helix* (activité comparée à l'étalon = 100).

Nos des poudres	1 ^{er} essai	2 ^e essai	3 ^e essai	Moyenne des résultats	Erreur rela- tive maximum p ^r 100
1	77	90		83,5	7,8
4	50	44	39	44,3	12,8
Moyenne des erreurs maxima pour 100					10,3

On voit, d'après ce tableau, que, dans le cas de la poudre n° 1, la divergence qui sépare deux déterminations successives est de 13 p. 100. Dans le cas de la poudre n° 4 elle est au plus de 11 p. 100. La moyenne des erreurs maxima pour 100 est de 10,3 p. 100.

II

RENSEIGNEMENTS FOURNIS PAR LE CALCUL D'ERREURS

Les règles fournies par les méthodes de calcul statistique permettent de déterminer, d'une part, l'ordre de grandeur des réserves qu'on doit faire aux résultats expérimentaux, d'autre part l'erreur maximum commise dans les essais⁽¹⁾. Le premier renseignement est fourni par une règle de calcul, nommée « *Standard Deviation of the average* », par les auteurs anglais (TREVAN, 143; BURN, 14; K. COWARD, 39) qui l'ont introduite dans les sciences biologiques et que l'on traduit improprement peut-être par *écart individuel moyen*. Cette formule se calcule de façon différente pour les méthodes de détermination d'une dose active ou mortelle individuelle et les méthodes statistiques. Nous envisagerons successivement ces deux cas. De ce facteur on déduit facilement l'erreur maximum pour 100. Ces règles proposées par TREVAN ont été modifiées par divers auteurs. Pour nos expériences, ce sont cependant celles-ci que nous avons adoptées, suivant l'exemple de BURN.

§ 1. — CALCUL D'ERREURS DANS DES MÉTHODES DE PERFUSION LENTE

Nous envisagerons d'abord le calcul de l'*écart individuel moyen* ou de l'écart de pourcentage, et ensuite le calcul de l'erreur maximum pour 100.

(1) Une mise au point claire et détaillée de la question a été faite dans une conférence à la Société de Pharmacie par MM. PENAU et SIMONNET dans le livre du Professeur LAUNOY et de Mlle LÉVY.

1° « STANDARD DEVIATION OF THE AVERAGE » OU ÉCART INDIVIDUEL MOYEN.

C'est la formule de TREVAN, la première en date, que nous avons appliquée. L'écart individuel moyen est donné par :

$$E = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n(n-1)}}$$

où d représente l'écart entre chacune des doses minima mortelles et la dose minimum mortelle moyenne, et n le nombre d'animaux utilisés dans l'essai.

La courbe en clocher, utilisée en calcul statistique et en balistique, montre que la *dose minimum mortelle trouvée* diffère de la *dose minimum mortelle réelle*, dans deux cas sur trois, d'une valeur égale ou inférieure au chiffre trouvé par ce mode de calcul. Une fois sur trois, l'écart est supérieur à ce chiffre.

Si à cette dose, trouvée expérimentalement, on ajoute ou soustrait deux fois cet écart individuel moyen, on obtient la dose qui est réelle 21 fois sur 22. Enfin, si à la dose expérimentale, on ajoute trois fois l'écart individuel moyen, on obtient la dose qui est réelle 369 fois sur 370.

Soit M la dose minimum mortelle trouvée expérimentalement, la dose minimum mortelle réelle telle que nous venons de la définir est égale à :

$D = M \pm E$ dans 2 expériences sur 3.

$D = M \pm 2 E$ dans 21 expériences sur 22.

$D = M \pm 3 E$ dans 369 expériences sur 370.

2° ERREUR MAXIMUM POUR 100.

Ce raisonnement a conduit TREVAN à calculer l'erreur maximum p. 100 qui peut être commise dans les essais, d'après la formule suivante :

$$\text{Erreur maximum pour 100} = \frac{300 \text{ E}}{\text{M}}$$

Pour chacun de nos essais par les méthodes de perfusion lente sur le cobaye et le lapin, nous avons calculé l'écart individuel moyen et l'erreur maximum p. 100. Les tableaux suivants comprennent les valeurs de la *Standard Deviation of the average* ou E, de 3 E, de $M \pm 3 \text{ E}$, enfin de l'erreur maximum p. 100 de chacun des produits essayés.

TABLEAU 33. — *Renseignements fournis par le calcul d'erreurs pour la méthode de perfusion lente sur le cobaye.*

Nature des colatures perfusées	Standard déviatiion of the average (E)	3E	Dose minim. mortelle dans 369 cas sur 370 ($M \pm 3 \text{ E}$)	Erreur maximum pour 100 300 E M
Colat. alcoolique :				
Poudre N° 1.....	2,5	7,5	$56,9 \pm 7,5$	13
Poudre N° 2.....	1,41	4,2	$48,1 \pm 4,2$	8,9
Poudre N° 4.....	4,9	14,7	$98,4 \pm 14,7$	14,8
Inf. à 1 p. 200 :				
Poudre N° 1.....	1,08	3,24	$34 \pm 3,24$	8,8
Poudre N° 2.....	1,16	3,48	$27,2 \pm 3,48$	12,7
Poudre N° 3.....	1,1	3,3	$31,4 \pm 3,3$	10,5
Poudre N° 4.....	1,84	5,52	$71,6 \pm 5,5$	7,6
Inf. à 1 p. 1200 :				
Poudre N° 1.....	1,7	5,1	$24,1 \pm 5,1$	21
Poudre N° 2.....	1,1	3,3	$28,4 \pm 3,3$	11
Inf. à 1 p. 650 :				
Poudre N° 3.....	1,1	3,3	$30 \pm 3,3$	11,1

L'examen du tableau 33 qui concerne les essais sur le cobaye montre que les erreurs maxima p. 100 commises varient de 9, 3 à 15,8 dans 9 cas. Dans un dixième cas, cette erreur atteint 21,5 p. 100.

TABLEAU 34. — *Renseignements fournis par le calcul d'erreurs pour la méthode de perfusion lente sur le lapin.*

Nature des colatures perfusées	Standard déviati of the average (E)	3E	Dose minim. mortelle dans 369 cas sur 370 (M $\pm$ 3 E)	Erreur maximum pour 100 300 E M
Colat. alcool. :				
Poudre N° 1.....	1	3	36,1 $\pm$ 3	8,3
Poudre N° 2.....	1,94	5,8	30,3 $\pm$ 5,8	19
Poudre N° 4.....	3,74	11,2	136 $\pm$ 11,2	8
Inf. à 1 p. 200 :				
Poudre N° 1.....	1,56	4,6	17,9 $\pm$ 4,6	26
Poudre N° 2.....	1,47	4,4	18,3 $\pm$ 4,4	24
Poudre N° 4.....	6,1	18,3	75,7 $\pm$ 18,3	24,2

Le tableau 34 qui concerne les essais sur le lapin montre que, pratiquée sur six animaux, la méthode de perfusion lente sur le lapin est moins précise que la méthode de perfusion lente pratiquée sur 10 cobayes. Dans deux cas, sur six, l'erreur maximum est de 8 p. 100. Dans les quatre autres, elle varie de 17 à 26 p. 100.

§ 2. — CALCUL D'ERREURS DANS LES MÉTHODES STATISTIQUES
DE POURCENTAGES D'EFFETS ÉMÉTIQUES SUR LE PIGEON
OU DE TOXICITÉS SUR LE CŒUR ISOLÉ D'HELIIX POMATIA

Pour ces méthodes, nous avons saisi également la règle de calcul de TREVAN (143), adoptée par BURN (14), qui consiste essentiellement à déterminer la *Standard Deviation of the average*, qu'on peut traduire imprpement par *écart de pourcentage moyen*, c'est-à-dire écart moyen entre le pourcentage trouvé et le pourcentage réel. Du chiffre obtenu on déduit par un même mode de calcul que dans la méthode précédente, l'erreur maximum p. 100.

1° « STANDARD DEVIATION OF THE AVERAGE » OU ÉCART
DE POURCENTAGE MOYEN.

Cet écart de pourcentage est déterminé sans qu'entre en jeu la dose qui l'a provoqué. Il est donné par la formule suivante :

$$C = \sqrt{\frac{P \times Q}{N}}$$

Dans cette formule, P représente le pourcentage d'animaux qui réagissent;

Q le pourcentage d'animaux qui ne réagissent pas;
N le nombre d'animaux mis en expérience.

Le chiffre obtenu est celui qu'il faut ajouter et soustraire du pourcentage expérimental pour obtenir les limites dans lesquelles se trouve placé le pourcentage réel deux fois sur trois.

En d'autres termes, deux fois sur trois, lorsque la totalité des animaux a reçu la dose du produit à essayer, le pourcentage des animaux qui réagissent n'est pas inférieur à $P - C$ et n'est pas supérieur à $P + C$. Si $P - C$ égale y et $P + C$ égale x, l'écart qui sépare

les pourcentages extrêmes susceptibles d'être obtenus correspond à $x - y$.

2° ERREUR MAXIMUM POUR 100.

Cet écart de pourcentage conduit à l'erreur maximum p. 100, que l'on détermine au moyen de la courbe d'action du produit essayé.

En effet, les deux pourcentages maximum et minimum situés en ordonnées de la courbe sont représentés en abscisses par deux chiffres arbitraires, correspondant aux doses de colature injectées. Ces deux chiffres représentent les variations extrêmes de l'erreur expérimentale. L'erreur maximum p. 100 dans deux cas sur trois est donnée par la formule :

$$\frac{(x - y) \times 100}{x}$$

dans laquelle x représente le chiffre des abscisses correspondant au pourcentage le plus élevé, et y celui qui correspond au pourcentage le moins élevé.

L'erreur maximum p. 100 dans 21 cas sur 22 est égale à :

$$\frac{2 (x - y) \times 100}{x}$$

Pour obtenir l'erreur maximum p. 100 dans 369 cas sur 370, il faudrait prendre le coefficient 3.

Nous avons calculé, tant pour la méthode statistique d'action émétique sur le pigeon que pour celle d'action toxique sur le cœur isolé d'*Helix*, les erreurs maxima susceptibles d'être commises pour chacun des divers pourcentages déterminés expérimentalement. Les tableaux suivants comportent la dose injectée, le pourcentage de réactions qu'elle produit, l'écart de pourcentage calculé par la formule :

$$C = \sqrt{\frac{P \times Q}{N}}$$

et les erreurs maxima p. 100 dans 2 expériences sur 3, 21 sur 22, et 369 sur 370.

Il apparaît tout d'abord que pour les pourcentages les plus voisins de 100 ou de 0, les erreurs maxima p. 100 dans 21 cas sur 22, et surtout dans 369 cas sur

370, ne peuvent être calculées. En effet, $2 \sqrt{\frac{P \times Q}{N}}$

et surtout $3 \sqrt{\frac{P \times Q}{N}}$, tendent alors à être inférieurs à 0 ou supérieurs à 100.

De plus, ces tableaux confirmant les observations de TREVAN, montrent bien la nécessité de pratiquer les essais sur des pourcentages voisins de 50 pour lequel l'erreur est minimum.

TABLEAU 35. — *Erreurs maxima p. 100 déterminées par calcul statistique pour la méthode émétique sur le pigeon.*

Nombre de cm ³ de teinture injectés par kg.	Pourcen- tage de vomis- sements	Ecart de pourcen- tage C = + $\sqrt{\frac{P \times Q}{N}}$	Erreurs maxima %		
			(x-y) 100	(x-y) 200	(x-y) 300
			x	x	x
			2/3	21/22	369/370
0,045	17	7,6	29		
0,055	43,4	10,1	15	28	44
0,065	47,8	10,2	12	25	48
0,07	56,2	10,1	12	24	34
0,075	70	9,3	10	22	31
0,08	81	8	12	25	
0,085	87,5	6,7	14		
0,09	89,5	6,2	13		

TABLEAU 36. — *Erreurs maxima p. 100 déterminées par calcul statistique pour la méthode de toxicité sur le cœur isolé d'Helix.*

Nombre de cm ³ d'Inf. au 1/50 contenus dans la cardiographie	Pourcen- tage d'arrêt des ven- tricules	Ecart de pourcen- tage C. = + $\sqrt{\frac{P \times Q}{n}}$	Erreurs maxima %		
			(x-y) 100	(x-y) 200	(x-y) 300
			x	x	x
			2/3	21/22	369/370
4	10	6,7	30		
6	40	11	18	35	50
7	55	11	13	25	39
9	95	4,8	18		

Enfin, toutes les erreurs fournies par ces méthodes de pourcentages sont très importantes si l'on en croit le calcul statistique. Elles ne correspondent pas aux erreurs déterminées expérimentalement.

III

COMPARAISON DES RÉSULTATS FOURNIS PAR LES DIVERSES MÉTHODES

Nous avons groupé dans les tableaux suivants les valeurs respectives des diverses poudres, titrées par ces différentes méthodes.

TABEAU 37. — *Valeurs comparées des poudres essayées par diverses techniques physiologiques après épuisement par infusé aqueux à 1 p. 200.*

N ^{os} des poudres	Méthode de perfusion lente sur le cobaye	Méthode de perfusion lente sur le lapin	Méthode statistique sur le pigeon	Méthode statistique sur l'escargot
2	100	100	100	100
1	83	102	87	83
3	93		91	70
4	38	24	62	44

TABEAU 38. — *Valeurs comparées des poudres essayées par diverses techniques physiologiques après épuisement par l'alcool à 60° bouillant.*

N ^{os} des poudres	Méthode de perfusion lente sur le cobaye	Méthode de perfusion lente sur le lapin	Méthode statistique sur le pigeon	Méthode statistique sur l'escargot
2	100	100	100	100
1	84,3	85	92,5	
4	51,3	20	59	

L'examen de ces tableaux montre que, malgré la différence des tests utilisés, malgré la différence des espèces animales expérimentées dans ces méthodes, les rapports d'activité entre les poudres ne varient pas. La poudre 2 est toujours la plus toxique. La poudre 4 reste la moins active. Ainsi les résultats obtenus sont comparables qualitativement. Ils le sont aussi quantitativement. Toutefois, il est à noter, comme l'ont signalé BURN (19), RAPSON et UNDER-

HILL (120), que le dosage d'un échantillon actif est toujours plus précis que celui d'un échantillon faible. Le cas de la poudre 4 en est un exemple.

Enfin, malgré la similitude des résultats fournis par toutes ces méthodes, ce sont ceux donnés par la méthode de perfusion lente sur le cobaye et la méthode statistique d'action émétique sur le pigeon qui semble être les plus voisins.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1° La méthode de perfusion lente sur le cobaye et le lapin la méthode de détermination statistique d'effet émétique sur le pigeon et d'arrêt du ventricule isolé d'*Helix pomatia* donnent des résultats suffisamment constants et homogènes pour être appliquées au dosage biologique de la Scille.

2° L'erreur relative moyenne est de 5 p. 100 pour la méthode utilisant le pigeon, de 10,3 p. 100 pour la détermination de la toxicité sur les ventricules isolés d'*Helix*.

3° L'écart individuel moyen, calculé théoriquement suivant les règles de TREVAN, est de 1 à 4 p. 100 pour le cobaye, de 1 à 6 p. 100 pour le lapin.

L'erreur maximum pour 100 commise ne dépasse pas 15 p. 100 pour la méthode de perfusion sur le cobaye, 25 p. 100 pour la méthode utilisant le lapin.

4° A condition d'effectuer le dosage de la Scille non pas en valeur absolue mais par rapport à un étalon de référence, les quatre méthodes étudiées fournissent des résultats très voisins. Cependant les deux méthodes de choix en raison de leur précision et leur caractère économique sont la perfusion lente chez le cobaye et la détermination statistique des effets émétiques chez le pigeon.

TROISIEME PARTIE

Etude du choix et de la valeur d'un étalon de Scille

Pour qu'un essai biologique devienne un véritable dosage et prenne une valeur indiscutable, il est nécessaire, comme on sait, de déterminer l'activité du médicament étudié par rapport à celle d'un étalon. Il existe pour de nombreuses drogues des étalons spécifiques et stables et ceux-ci sont établis et définis par les Commissions Internationales chargées de la standardisation biologique des médicaments. Mais, en ce qui concerne l'étalon de Scille, ces Commissions n'ont encore pris aucune décision. Aussi, notre travail serait resté incomplet si, après avoir mis au point quelques techniques de dosage biologiques de la Scille, nous n'avions envisagé la création d'un étalon de cette drogue.

Malgré l'absence d'un étalon « officiel », de nombreuses recherches ont, cependant, été effectuées dans le but de définir un étalon de Scille. C'est ainsi qu'ont été proposés, soit des digitaliques qualitativement différents de la Scille (ouabaïne) (SCHWARTZE, HANN et KEENAN, 128; Codex U.S.A., 119) (digitale), soit des préparations galéniques de Scille (teinture et poudre de Scille), soit enfin un de ses constituants glucosidiques (scillarène A). Eliminant d'emblée la

Digitale ou l'ouabaïne, qui, bien qu'ayant semblé donner des résultats satisfaisants à ROSEN (121), nous a paru d'action pharmacologique trop différente de la Scille, pour mériter d'être étudié. Il nous restait à choisir entre les préparations galéniques de cette drogue et le scillarène.

Le scillarène A, bien qu'adopté par la Pharmacopée Belge (119 *bis*), ne peut, d'après Jeanne LÉVY et CAHEN (96), que servir d'étalon provisoire en raison de sa préparation brevetée. De plus, comme nous avons pu le constater, son action n'est pas absolument superposable à celle de la *Scille totale* du « *totum* », pour employer l'expression du Professeur PERROT (118). Il était donc nécessaire de choisir comme étalon une préparation galénique de Scille. Parmi celles-ci, la teinture qui avait donné au Professeur BURN (17) de bons résultats, nous a paru constituer un étalon d'un usage moins général que la poudre préconisée par MM. MASCRÉ, Jeanne LÉVY et CAHEN (107). C'est cet étalon de Scille que nous avons utilisé pour nos dosages et nous en avons étudié la préparation et la valeur. Ces divers points seront successivement examinés dans cette dernière partie de notre travail. Après avoir effectué l'étude critique et le choix de divers étalons nous avons rappelé le mode de préparation de l'étalon, envisagé le titre qu'il était nécessaire d'exiger, et contrôlé sa stabilité.

I

ÉTUDE CRITIQUE ET CHOIX DES DIVERS ÉTALONS DE SCILLE

Comme l'a énoncé sir Henry DALE (41), l'étalon choisi pour un dosage biologique doit être soit le

principe actif, soit le produit responsable de l'activité pharmacologique d'une drogue. En ce qui concerne la Scille, deux étalons semblaient utilisables, l'un était un de ses constituants, glucoside cristallisé, défini par ses constantes physiques, le scillarène A, l'autre une préparation galénique de Scille. Nous avons cherché à vérifier la valeur de la spécificité de ces étalons, en utilisant le principe formulé par GADDUM (52), EDMUNDS, LOWEL et BRADEN (47, 48, 49), BURN (17) ; ces auteurs en effet ont pu montrer que, pour qu'un étalon s'avère satisfaisant pour le dosage biologique d'une substance médicamenteuse, il est nécessaire que les résultats obtenus par diverses méthodes soient très voisins, nous résumerons les expériences effectuées à ce sujet.

§ 1. — SCILLARÈNE A

Nous avons donc cherché à doser 4 poudres de Scille par rapport au scillarène A ⁽¹⁾ chez le cobaye et le lapin.

Bien que la toxicité de ce glucoside ait déjà été déterminée sur le cobaye par une méthode voisine par Jeanne LÉVY et OTTERSTRÖM (98), nous avons jugé nécessaire de refaire cette détermination sur des animaux provenant d'un même élevage et placés dans les mêmes conditions physiologiques que ceux employés à l'essai de nos préparations de Scille. Les doses minima mortelles obtenues figurent aux tableaux suivants. Leur moyenne est de 0 mmgr. 307 pour 1 kg de cobaye et de 0 mmgr. 8 pour 1 kg de lapin.

(1) Le Scillarène étudié dans ce travail nous a été obligeamment fourni par le Docteur ROTHLIN auquel nous tenons à adresser ici nos très vifs remerciements.

TABLEAU 39. — *Détermination de la toxicité du Scillarène A par perfusion lente sur le cobaye.*

Poids (kg.) et sexe	Nombre de cm ³ perfusés par minute et par kg.	Nombre de cm ³ perfusés	Nombre de cm ³ perfusés par kg.	Temps nécessaire à l'arrêt du cœur	Nombre de mmgr. de scillarène perfusés par kg.
380 ♂	1,7	7,55	19,8	16	0,26
410 ♀	1,7	8,80	21,4	15	0,25
530 ♂	1,7	11,7	22	13	0,29
691 ♂	1,7	16,9	24,5	17	0,32
287 ♂	1,7	6,60	22,2	17	0,29
277 ♀	1,7	6,70	24,1	16	0,29
417 ♀	1,7	10,05	24,1	16	0,32
303 ♂	1,7	6,79	22,4	15	0,29
445 ♂	1,7	10,6	23,8	15	0,35
356 ♂	1,7	6,9	19,3	13	0,38

TABLEAU 40. — *Détermination de la toxicité du Scillarène A par perfusion lente sur le lapin.*

Poids (kg.) et sexe	Nombre de cm ³ perfusés par minute et par kg.	Nombre de cm ³ perfusés	Nombre de cm ³ perfusés par kg.	Temps nécessaire à l'arrêt du cœur	Nombre de mmgr. de scillarène perfusés par kg.
2,085 ♀	0,24	13,7	6,57	27	0,657
2,060 ♀	0,24	21	10	52	1,01
1,740 ♀	0,24	18,06	10,03	47	1,03
1,685 ♀	0,24	11,20	6,64	28	0,664
1,730 ♂	0,24	11,89	6,87	29	0,687
1,950 ♀	0,20	16	8,20	40	0,82
1,735 ♂	0,20	7,86	4,53	23	0,60
2,090 ♀	0,23	12	5,74	25	0,76
1,590 ♂	0,22	55,6	34,96	28	0,92
1,750 ♂	0,2	64,5	36,8	30	0,97

Il résulte de ces expériences que le lapin est beaucoup moins sensible au scillarène que le cobaye; or il apparaît des essais sur la Scille elle-même, décrite dans la première partie de ce travail, que le lapin est plus sensible à la Scille que le cobaye. Il faut 33 mmgr. 9 de poudre n° 1 épuisée par double infusion pour tuer 1 kg de cobaye. Il n'en faut que 16 mmgr. 5 pour tuer 1 kg de lapin. Un animal peut donc réagir différemment à une poudre de Scille et au scillarène.

Ces résultats s'expliquent vraisemblablement par une différence d'action pharmacologique entre le scillarène et le « *totum* » Scille. Il est fort plausible, en effet, que dans une drogue aussi complexe que la Scille, à côté du principe dominant, d'autres constituants agissent, influent sur son absorption et son élimination.

C'est là un point qui apparaît très important et qui permet de tirer quelques conclusions non seulement sur le choix d'un étalon de Scille mais encore sur le problème plus général de pharmacie galénique, la comparaison des principes chimiques définis avec les formes galéniques. L'existence d'une différence d'action entre la Scille et le scillarène A semble indéniable, fait qui mérite d'être rapproché de ceux constatés pour d'autres drogues végétales par de nombreux auteurs : Complexe tannoglucosidique ou Cola stabilisée et caféine (Prof. GORIS, 59), totum « *Digitalis lanata* » et glucosides (Prof. PERROT (117, 118), Digitale et digitaline (Prof. POUCHET).

En ce qui concerne le choix d'un étalon des préparations de Scille, la divergence de sensibilité respective des animaux au scillarène et à la Scille montre que ce glucoside ne saurait convenir.

Tout au plus, il nous semble que ce produit défini

et stable peut être utilisé comme étalon secondaire, c'est-à-dire comme élément de comparaison en cas d'altération, de renouvellement ou de contrôle de l'étalon. Comme tel, et dans ces conditions seulement, en précisant minutieusement le choix de l'animal et le protocole expérimental, le scillarène peut rendre les mêmes services que l'ouabaïne, pseudo-standard de la strophanthine amorphe et des préparations de strophanthus (Codex Britannique, 12, et U.S.P.X., 119).

§ 2. — POUDRE DE SCILLE ÉTALON

Parmi les préparations galéniques de scille, deux d'entre elles pouvaient être utilisées, la teinture déjà proposée par le Professeur BURN, la poudre adoptée par MM. MASCRÉ, Jeanne LÉVY et CAHEN. Nous avons choisi cette dernière et nous avons dosé par comparaison à cet étalon différentes préparations de Scille. Dans les tableaux suivants sont indiqués en pourcentage et en « unité d'activité » les valeurs respectives de la poudre étalon et des autres poudres essayées par quatre méthodes biologiques.

TABLEAU 41. — *Valeurs comparées, exprimées par rapport à l'Étalon de trois poudres de Scille, tirées par quatre méthodes biologiques et épuisées par l'eau et l'alcool.*

Nos des poudres essayées	Méthodes de perfusion lente				Méthodes statistiques		
	sur le cobaye		sur le lapin		sur le pigeon		sur <i>l'Helix pomatia</i>
	Tein- ture	Infusé	Tein- ture	Infusé	Tein- ture	Infusé	Infusé
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Etalon)							
2	100	100	100	100	100	100	100
1	84	83	85	102	84	87	83
3		93			91		70
4	51	41	19	24	50	62	44

TABLEAU 42. — *Valeurs comparées, exprimées en unités de difficulté de la poudre Etalon et des trois autres poudres de Scille titrées par quatre méthodes biologiques et épuisées par l'eau et l'alcool*

N ^{os} des poudres essayées	Méthodes de perfusion lente				Méthodes statistiques		
	sur le cobaye		sur le lapin		sur le pigeon		sur <i>l'Helix pomatia</i>
	Tein- ture	Infusé	Tein- ture	Infusé	Tein- ture	Infusé	Infusé
2	20	20	20	20	20	20	20
1	16,8	16,6	17	20,2	16,8	17,4	16,6
3		18,6				18,2	14
4	10,2	7,6	3,8	4,8	11,8	12,4	8,8

Ces tableaux montrent, qu'aux erreurs d'expériences près, les valeurs comparées de la poudre étalon et des diverses poudres essayées restent les mêmes, quelle que soit la technique physiologique employée. On peut donc penser que la poudre proposée constitue un étalon spécifique des préparations de Scille.

II

ÉTUDE DE LA PRÉPARATION D'UN ÉTALON DE SCILLE

Quatre poudres de Scille ont été choisies en vue de la préparation d'un étalon. La première était une

poudre commerciale de bonne qualité. La seconde nous avait été fournie par MM. MASCRÉ, Jeanne LÉVY et CAHEN, à qui elle avait servi d'étalon. Les deux dernières ont été préparées par nos soins au laboratoire. Pour cette préparation, nous avons pris les précautions fixées par ces auteurs, notamment en ce qui concerne la fermentation par entassement. Les conditions optima de dessiccation et de pulvérisation (séjour à l'étuve à 60°; tamis n° 45) qu'ils y indiquent ont été suivies rigoureusement; nous ne reviendrons pas sur cette question qui est d'ailleurs résumée dans la première partie de ce travail. Nous signalerons cependant un point important; chacune de ces poudres a été préparée à partir d'un lot de même origine botanique et géographique d'*Urginea Scilla Steinh*, mais de végétations différentes. Essayées par les méthodes biologiques précédentes, ces quatre poudres se sont montrées d'activités variées. Ces différences d'activité nous fournissaient la possibilité de préparer, par des mélanges appropriés, un étalon dont nous pouvions fixer approximativement l'activité.

III

ÉTUDE DU TITRE DE L'ÉTALON

Le problème du titre qu'il convient d'exiger d'un étalon est très complexe et les pharmacologues se sont rendus compte de sa difficulté au moment de la préparation de l'étalon de Digitale.

Deux principes directeurs peuvent être suivis à ce sujet; le premier proposé par MAGNUS (104), pour l'étalon de Digitale et adopté par la Commission per-

manente de standardisation biologique de Francfort (1928) (140), consiste à préparer l'étalon par mélange de dix poudres d'origine et d'activités différentes ; le produit ainsi obtenu possède une activité correspondant à la moyenne de celle de ces poudres. Une telle méthode présente donc l'avantage de permettre au pharmacien de toujours préparer un produit atteignant le titre proposé, puisqu'il représente une moyenne des poudres utilisées en clinique.

Le second principe directeur, adopté en mai 1931 par les Commissions de la Pharmacopée Britannique et récemment par la Commission d'Hygiène de la S. D. N. pour la préparation du nouvel étalon de Digitale, consiste au contraire à choisir comme étalon la poudre trouvée la plus active. Ce procédé offre l'avantage sur le précédent d'éviter le mélange d'échantillons actifs avec des échantillons de qualité inférieure.

C'est ce second procédé que nous avons adopté pour la préparation d'un Etalon de Scille. La plus active des quatre poudres essayées nous a servi d'Etalon pour tous nos essais physiologiques.

§ 1. — TITRE DE L'ÉTALON DE SCILLE

Si l'essai biologique de la Scille est adopté par la Commission du Codex, il sera nécessaire de définir l'activité qu'il convient d'exiger d'un étalon. De nombreuses expériences sont indispensables à ce sujet. Dans l'état actuel de nos recherches et pour nos essais personnels, nous avons adopté l'étalon suivant :

1° L'étalon de Scille possède une teneur en eau de 3,60 p. 100.

2° Il se caractérise par l'activité physiologique ainsi déterminée :

Par perfusion lente sur le cobaye et le lapin, la dose minimum mortelle moyenne d'une telle poudre épuisée par double infusé à 1 p. 200 est de 28 mmg. 3 par kg de cobaye et de 17 mmg. 2 par kg de lapin exprimée en poudre anhydre (1).

On sait que, sous l'instigation de Sir Henry DALE, les Conférences Internationales et la Pharmacopée Britannique ont exprimé l'activité de l'étalon de Digitale en « *unité d'activité* ». Nous proposons d'adopter pareille mesure pour la Scille et nous suggérons, comme l'ont proposé pour d'autres substances DALE, (41), BURN (15), CAHEN (24), que cette « *unité d'activité* » soit définie, non pas par une *réaction physiologique*, mais par un *certain poids d'étalon*. « Un poids déterminé de Scille renferme une *unité d'activité* » que nous avons choisie, à titre purement conventionnel quand il possède la même activité physiologique que 0 gr. 05 d'étalon, épuisé par double infusé aqueux. Un gramme de cette poudre contient donc 20 unités. Ainsi un échantillon de Scille, dont l'activité sera égale à 80 p. 100 de celle de cet étalon, contiendra 16 unités au gramme. De même un autre échantillon dont l'activité sera égale à 120 p. 100 de celle de l'étalon contiendra 24 unités au gramme.

§ 2. — TITRE D'UNE POUDRE COMMERCIALE DE SCILLE

Le titre ainsi défini pour l'étalon permet de fixer, dès maintenant, le titre qu'il convient d'exiger d'une poudre de Scille pour que celle-ci présente des effets thérapeutiques suffisants. Une poudre commerciale de très bonne qualité, préparée dans des conditions minutieuses et conservée avec précautions, devra

(1) Ces résultats ont fait l'objet d'une communication à la Société de Pharmacie.

présenter une activité voisine de celle de cet étalon. Comme l'avaient constaté MM. MASCRÉ, Jeanne LÉVY et CAHEN et comme nous avons pu le vérifier, beaucoup de ces poudres présentent une activité notablement inférieure. Il est donc nécessaire de définir le titre minimum d'une poudre commerciale et il est à souhaiter que comme pour la Digitale celui-ci soit de 75 à 125 p. 100 de celui de l'étalon sur le cobaye et le lapin. Nous pouvons donc ainsi définir l'activité minimum d'une poudre commerciale: la dose minimum mortelle d'une telle poudre titrée par perfusion lente ne doit pas être supérieure à 35 mgr. par kg. de cobaye et à 21,5 mgr. par kg. de lapin.

Pour les méthodes statistiques, non seulement il n'est pas possible, en raison des variations de réactivité individuelles, de fixer un tel titre mais une telle mesure serait d'ailleurs inutile puisque ces méthodes sont essentiellement comparatives.

IV

CONTROLE DE LA STABILITÉ DE L'ÉTALON

Un étalon actif et spécifique doit aussi présenter certaines garanties de stabilité. MM. MASCRÉ, Jeanne LÉVY et CAHEN (107, 108) ont étudié les conditions assurant la stabilité d'une poudre de Scille. Ces auteurs ont montré qu'une poudre préparée selon leur technique, ne titrant pas plus de 4 à 5 p. 100 d'eau, et conservée en flacons paraffinés ou en ampoules scellées, garde une activité inchangée après un an au moins. Leurs expériences nous ont paru suffisamment démonstratives; notre poudre étalon remplis-

sant toutes les conditions indiquées par eux, nous n'avons pas repris leurs travaux.

D'ailleurs, comme nous l'avons déjà signalé, il est possible de comparer l'activité de l'étalon à celle de l'étalon secondaire, le scillarène A. Un gramme d'étalon de Scille, épuisé par un infusé à 1 p. 200 et titré par perfusion lente sur le cobaye, équivaut à 10 mmg. 8 de scillarène A. Un gramme de la même poudre, soumise au même mode d'épuisement, mais titrée par perfusion lente sur le lapin, équivaut à 48 mmg. de scillarène A.

Telle que nous l'avons définie, une « unité d'activité » de cette poudre étalon titrée sur le cobaye et épuisée par infusion à 1 p. 200, est égale à 0 mmg. 54 de scillarène A. Dans les mêmes conditions, mais en opérant sur le lapin, cette « unité » équivaut à 2 mmg. 4 de glucoside.

CONCLUSIONS

1° Il est constitué un *étalon* de Scille préparé par pulvérisation et dessiccation de bulbes d'*Urginea Scilla Steinh*, choisi comme l'échantillon le plus actif.

2° Cet étalon possède une teneur en eau de 3,60 p. 100 et se caractérise par son activité physiologique : la dose minimum mortelle de l'étalon de Scille, épuisé par infusé aqueux à 1 p. 200, déterminée par perfusion lente est de 28 mmg. 3 sur le cobaye et de 17 mg. 2 sur le lapin. Une unité d'activité de Scille, que nous avons définie conventionnellement pour la commodité des calculs, est représentée par l'activité exercée par 5 centigrammes de cet étalon.

3° L'étalon proposé se montre satisfaisant pour effectuer le dosage de diverses préparations de Scille.

4° Le scillarène A ne peut servir que d'*étalon secondaire* en cas d'altération du stock de l'étalon.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Dans ce travail, consacré à l'étude du dosage biologique de la Scille, trois problèmes ont été envisagés : la mise au point des méthodes de dosage biologique de la Scille ; la recherche de son mode d'épuisement optimum en vue de préparer un soluté destiné à l'essai biologique, enfin, le choix d'un étalon destiné à servir de référence pour le dosage.

En voici les conclusions générales :

I. — MÉTHODES DE DOSAGE BIOLOGIQUE DE LA SCILLE

1° MÉTHODE DE PERFUSION LENTE : a) La méthode de perfusion lente utilisant comme test la toxicité cardiaque peut être appliquée au dosage biologique de la Scille en recourant comme animal d'expérience au cobaye et au lapin, anesthésiés à l'uréthane et non soumis à la respiration artificielle.

b) Les résultats obtenus en opérant ainsi sont constants à condition de pratiquer une perfusion lente, continue, en un temps voisin de 20 minutes chez le cobaye et de 30 minutes chez le lapin.

c) Bien que son maniement soit plus délicat, la méthode de perfusion lente chez le cobaye est plus rigoureuse que chez le lapin. Les erreurs maxima

qu'on détermine par les règles du calcul statistique, ne dépassent pas 15 p. 100 pour le cobaye et 25 p. 100 pour le lapin.

2° MÉTHODES STATISTIQUES : a) La méthode de dosage basée sur la toxicité sur le ventricule isolé d'escargot et consistant à déterminer le pourcentage d'organes arrêtés sous l'influence d'une dose de Scille, constitue une méthode d'essai rapide et économique. Toutefois, dans l'état actuel de nos expériences, il ne semble pas que cette méthode présente une rigueur comparable à celle des autres méthodes.

b) La méthode statistique de détermination de l'effet émétique chez le pigeon est, à la fois, économique, pratique, fidèle et rigoureuse.

3° *La discussion des résultats expérimentaux conduit à considérer comme méthodes de choix pour le dosage biologique de la Scille, la perfusion lente sur le cobaye, et la détermination statistique des effets émétiques chez le pigeon.*

II. — MODE D'ÉPUISEMENT OPTIMUM DE LA SCILLE EN VUE DE LA PRÉPARATION D'UN SOLUTE DESTINÉ A L'ESSAI BIOLOGIQUE

1° A dose égale et pour un même échantillon de Scille, l'infusé aqueux à 1 p. 200 est 40 p. 100 plus actif que la teinture alcoolique au 1/10 sur le cobaye, le lapin et le pigeon. Il est de même activité ou d'activité moindre sur le cœur isolé d'escargot.

2° Quel que soit le mode d'épuisement utilisé, l'activité de divers échantillons de Scille par rapport à

une préparation choisie comme étalon reste la même.

3° *L'infusé aqueux à 1 p. 200 constitue la préparation la meilleure pour l'essai biologique en raison de sa commodité et de la rapidité de sa préparation.*

III. — CHOIX D'UN ÉTALON DESTINÉ AU DOSAGE BIOLOGIQUE DE LA SCILLE

1° Un *étalon* de Scille a été constitué représentant la plus active parmi les diverses poudres préparées.

2° Cet étalon présente une teneur en eau qui est de 3,60 p. 100 et peut être caractérisé par sa toxicité; *la dose minimum mortelle de l'étalon épuisé par double infusion aqueuse à 1 p. 200, est de 28 mg. 30 par kg. de cobaye et de 17 mg. 20 par kg. de lapin.* Ainsi, un gramme de poudre contient 3,53 doses mortelles pour le cobaye et 5,80 pour le lapin.

Comme pour la Digitale, nous suggérons d'adopter arbitrairement une « *unité* » de Scille définie comme représentant l'activité exercée par 0 gr. 05 d'étalon.

3° L'étalon proposé se montre satisfaisant pour le dosage des préparations galéniques de Scille. En effet, *le dosage de Scille par rapport à cet étalon suivant quatre méthodes biologiques différentes fournit des résultats identiques.*

4° En raison des divergences de sensibilité des animaux vis-à-vis de la Scille et d'un de ses principes actifs cristallisés, le scillarène A, ce glucoside ne peut servir que d'étalon secondaire, c'est-à-dire d'élément de comparaison stable avec la poudre étalon.

Titre sur même lot d'animaux maintenus dans les mêmes conditions physiologiques, un gramme de poudre étalon correspond à 10 mg. 80 de scillarène A

sur le cobaye et à 48 mg. de ce glucoside sur le lapin. Ainsi, une unité de Scille équivaut à 0 mg. 54 de scillarène A sur le cobaye et à 2 mg. 40 de scillarène A sur le lapin.

Vu :
LE DOYEN,
P. GUERIN.

Vu :
LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE
A. GORIS

Vu et permis d'imprimer :
LE RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,
S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALDAY-REDONNET (T.). — Die sogenannte Titrierung des Digitalis präparate an Fröschen. *Cor. Bl. f. Schweiz Herzte*, 1917, 47, 974-978.
2. — Valoracion biologica de los medicamentos digitalicos. *Arch. cardiol. y hemat.*, 1932, 13, 347, 396.
3. — Auswertung der Digitalispräparate mit der Methode von Reed und Vanderkleed. *Rev. Espan. Biol.*, 1932, 1, 7, 9.
4. ANDRUS (E. C.). — Action de certaines modifications dans les perfusats sur les oreillettes isolées du lapin. *J. of Physiol.*, 1924, 59.
5. BAUER (H.). — Zur Kenntniss der Ursachen der Kumulierungserscheinungen der Digitalisglykoside, reversible und irreversible Digitaliswirkungen. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1934, 176, 65, 73.
6. BEAUNE (A.). — Contribution à l'étude pharmacologique de quelques glucosides cardiotoniques (ouabaïne, K. strophantine, Cymarine et convallamarine). 1934, Vigot frères, Paris.
7. BEAUNE (A.) et BALACEANU (V.). — Action de quelques cardiotoniques sur le ventricule isolé d'escargot. *B. S. P.*, 1933, 40, 658.
8. BHATIA and S. LABB. — On the Biological assay of Digitalis by the frog method : Describing a characteristic Curve for *Rana tigrina*. *Indian J. Med. Res.*, 1934, 22, 3.

9. BINET (L.) et MARIE (L.). — Le cœur isolé d'escargot. *La Médecine*, 1932, 13, 958.
10. BOER (de). — Die pharmakologische Wirkung von Scillaren auf das Herz. *Arch. internat. Pharmacodyn.*, 1933, 46, 32, 44.
11. BOUILLOT (J.). — Appareil de laboratoire permettant de dessécher rapidement les composés organiques sans les altérer. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1923, 5, p. 3.
12. BRITISH PHARMACOPEIA. — Biological Assay of Powdered Digitalis. 1932, app. XV, 1, Constable et Co, London, 1932.
13. BULBRING (E.) et BURN (J. H.). — Oestrin and male hormone estimation in oily solution. *Journ. of Physiol.*, 1935, 85, 320.
14. BURN (J. H.). — Methods of biological assay. 1928, *Oxford Medical Publications*.
15. — Some methods of biological assay. *Pharm. J.*, 1926, 117, 576, 79.
16. BURN (J. H.) and TREVAN (J. W.). — The standard for the Biological assay of Strophantus, together with a Report on the assay by the frog method. *Pharm. J.*, 1926, 117, 439.
17. BURN (J. H.). — The Standard for the Biological Assay of Squill. *Pharm. J.*, 1927, 118, 328.
18. BURN (J. H.) et GREWALL (K. S.). — Strength of tinctures of strophantin B. P. N. of samples of strophantin related to international standard ouabain. *Quart. J. pharm. a. Pharmacol.*, 1929, 2, 404-408.
19. BURN (J. H.). — The estimation of digitalis by pigeon emesis and other methods. *J. of Pharmacol. and Exp. Ther.*, 1930, 39, 221, 39.
20. BUSQUET (H.). — La digitale et le groupe : Strophantus, Scille. *B. S. P.*, 1918, 88.
21. CAHEN (R.). — Toxicité comparée de l'ouabaïne cristallisée et de la Strophantine par la méthode d'Hatcher-Magnus sur le chien. *C. R. Soc. de Biol.*, 1929, 100, 1124.

22. — Dosage et étalonnage biologique de quelques glucosides cardiotoniques (ouabaïne, Digitaline, Scillarène, Cymarine). *Thèse de Doctorat en Pharmacie*, 1930, Paris, Imp. Cour d'Appel.
23. — Les méthodes de dosage biologique des cardiotoniques. *Bull. Assoc. Doct. Pharm.*, 1932. *Conférence Ass. Doct. Pharm.*, 8 novembre 1931.
24. — Principaux constituants actifs et méthodes de titrage biologique de l'extrait testiculaire. *Bull. Sc. Pharm.*, 43, 1936, p.
25. — Contribution à l'étude de l'accoutumance expérimentale à la morphine. *Thèse de Doctorat Sc. P.*, 1935, 1 vol., 225 pages, Soc. Fr. Impr., éd., Paris.
26. CAHEN (R.) et LAUNAY (L.). — Activité comparée des préparations aqueuses et alcooliques de Scille. *J. P. C.*, 1936, 23, 305.
27. — Sur la spécificité d'un étalon des préparations de Scille. *J. P. C.*, 1936, 23, 305.
- 27 bis — Méthodes statistiques de dosage biologique de la Scille. *Bull. de l'Ac. de Méd.*, 1936, 115, n° 28.
28. CARDOT (H.). — Sur les oscillations du tonus dans le cœur suspendu de l'escargot. *Soc. Biol.*, 1920, 83, 1376.
29. — Action des solutions de Ringer hypertoniques sur le cœur isolé d'escargot. *Soc. Biol.*, 1921, 85, 813.
30. — L'automatisme cardiaque d'après les recherches relatives aux Invertébrés. *Assoc. des Physiologistes*, 7^e Réunion, Liège, 7-10 juin 1933.
31. CARRATALA (R. E.). — Titulacion de la digital y sus preparados por methode quimico, empleando el colorimetre y controlada por el metodo de gato. *Rev. de criminol. psiqu. y med. leg.*, 1930, 17, 318-326, mai-juin 1930, et *Rev. de especialid.*, 1930, 5, 561-572.

32. — Titulacion biologica de la digital por el metodo de emesis. *Rev. de especialid.*, 1931, 6, 1281, 1297, et *Seman Med.*, 1931, 2, 1606, 1613.
33. CHEINISSE (L.). — La Scille réhabilitée en tant que médicament cardiaque. *Presse Méd.*, 1923, 684.
34. CHOPRA (R. N.) and CHOWHAN (J. S.). — Biological Assay of Digitalis Preparations in the Tropics. *Ind. J. Med. Res.*, 1933, 20, 1189-1195.
35. CLARK (A. J.). — The factors determining tolerance of glucoside to the digitalis series. *Journ. of Pharmacol. and Exp. Therap.*, 1913, 4, 399-433.
36. — The mode of action of alcohols and narcotics on the frog's ventricle. *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, 1930, 38, 101-110.
37. COLSON (H. C.) et ENGELHARDT (H.). — Is the biologic standard of squill and the preparations thereof correct ? *Journ. Am. Pharm. Assoc.*, 1917, 6, 950.
38. COUTIÈRE (H.). — Cardioréglaes. *Biol. Med.*, 1934, 24, 57.
39. COWARD (K.). — The accuracy of Biological estimation of vitamins. *Copied from the analyst*, 1934, 59, 681, 685.
40. COWARD (K.) et BURN (J. H.). — The variation in the unit of the oestrus producing Hormone. *J. Physiol.*, 1927, 3, 270.
41. DALE (H.). — Standardisation des substances thérapeutiques (Note présentée par le Docteur Dale à la Commission permanente de standardisation sur les progrès réalisés dans la standardisation internationale des substances thérapeutiques par les méthodes biologiques. Société des Nations, Genève, 1926). *B. S. P.*, 1927, p. 177.

42. DALE (H.). — Preface de *Methods of Biological Assay*. *Oxford University Presse*, 1928.
43. DEJEAN (E.). — Etude pharmaco-chimique comparée sur la Digitale sauvage, la Digitale cultivée et les digitalines. *Thèse Doct. Pharm.*, Montpellier, 1908.
44. DOCK W. STOCKTON (A. B.) et LEHMAN (A. J.). — Digitalis assay with the isolated cat heart, compared with other methods. *Amer. Heart Journ.*, 1933, 8, 707, 713.
45. DUBUISSON (M.). — L'état actuel de nos connaissances sur la Physiologie du muscle cardiaque des Invertébrés. Imp. « Les Presses Universitaires de France ». Paris.
46. EDDY (N. B.) et HATCHER (R. A.). — The seat of the emetic action of the digitalis bodies. *Journ. of Pharmacol. and exp. Therap.*, 1928, 33, 295, 300.
47. EDMUNDS (C. W.), LOWELL (H. W.) et BRADEN (S.). — Studies in bioassays, tincture of strophantus. *Journ. Am. Pharm. Ass.*, 1929, 18, 568, 573.
48. EDMUNDS (C. W.), LOWELL (H. W.) et BRADEN (S.). — Studies on bioassays. The proposed international standard for digitalis. *Journ. Am. Pharm. As.*, 1929, 18, 778, 784.
49. EDMUNDS (C. W.), LOWELL (H. W.) et BRADEN (S.). — Strophantin and ouabain biological Assays. *J. Amer. Pharm. Assoc.*, 1929, 18, 338; *Quarterly Journal of pharmacy and pharmacology*, 1929, 11, 667.
50. EGGLESTON (C.). — Biological standardisation of the digitalis bodies by the cat method of Hatcher. *Am. Journ. Pharm.*, 1913, 85, 99-122 (Chem. Abst., 7, 1950).
51. FOCKE (C.). — Ist ein stärkerer, gleichmässiger Wirkungswert des offiziellen *Bulbus scillae* erreichbar und wünschenswert? *Arch. der Pharmacie*, 1927, 265, 91, 96.

52. GADDUM (J. H.). — The biological assay of Strophanthus Kombé in comparison with ouabaine. *Quart. J. of Pharm. and Pharm.*, 1932, 5, 278.
53. GADDUM (J. H.). — Methods of Biological assay depending on a quantal response Medical research Council. London, 1933.
55. GAUTIER (R.). — L'organisation d'Hygiène et de la Standardisation biologique. *Bulletin trimestriel de l'organisation d'Hygiène de la Soc. des Nations*, vol. IV, extrait n° 8, p. 27.
56. GAUTRELET (J.). — Eléments de Technique physiologique. Masson et Cie, éditeurs.
57. GOLD (H.), BEN GELFAND et HITZIG (W.). — The use of therapeutic effects as end-points in the biologic titration of the digitalis bodies. *Journ. of Pharmacol.*, 1931, 41, 89-102.
58. GOLD (H.), TRAVELL (J.) et KWIT (N.). — Depression of the vomiting reflex by the digitalis bodies. *Amer. Heart Journ.*, 1931, 7, 165, 181.
59. GORIS (A.). — Sur un nouveau principe cristallisé de la kola fraîche. *C. R. Ac. Sc.*, 1907, 144, 1.162.
- 59 bis. GRAFT (W.). — Quantitative Untersuchung über die Reversibilität der Scillaglusosid als Beitrag zum Wirkungsmechanismus der Herzmittel. *Arch. f. exp. Path. u. Pharmk.*, 1929, 140, 355, 79.
60. GUNN (J. A. et A.) et HEATHCOTE (R. St.). — The alleged hypersusceptibility of the rat to squill. *Journ. of Physiol.*, 1921, vol. 54, 85, 86.
61. HAAG (H. B.). — The possible influence of ether anesthesia on the accuracy of the rat method of digitalis assay. *J. of the Am. Pharm. Ass.*, 1927, 16, 516.

62. HAAG (H. B.) and WOODLEY (J. D.). — The use of Pigeons in the Estimation of Digitalis. Potency. *J. Pharmac.*, 1934, 51, 360-9.
63. HAAG (A. B.) et WOODLEY (J. D.). — The effect of caffeine and theobromine upon digitalis toxicity. An experimental study. *Journ. of Pharma. and exp. Therap.*, 1935, 53, 465, 473.
64. HAMET (R.). — *Revue de Pharmacol. et Thérapeu. expér.*, 1929, 1, 212, 254.
65. HAMET (R.). — A propos de l'essai physiologique des digitaliques. *Bull. des Sc. Pharmacol.*, 1934, 4, 161, 164.
66. HANZLICK (P. J.). — A New Method of Estimating the Potency of Digitalis. Pigeon Emesis. *J. Pharm. and Exp. Ther.*, 1929, 35, 363, 9.
67. HANZLICK (P. J.). — The « use of therapeutic effects as end-points in the biologic titration of the digitalis bodies ». *Journ. of Pharmacol.*, 1931, 41, 383, 385.
68. HANZLIK (P. J.) et SHOEMAKER (H. A.). — Emetic doses of digitalis in pigeons as an index of the therapeutic dose in man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1926, 23, 298-299.
69. HANZLICK (P. J.) and WOOD (D. A.). — The mechanism of Digitalis Emesis in pigeons. *J. Pharm. and Exp. Ther.*, 1929, 37, 67-100.
70. HANZLICK (P. J.) et WOOD (D. A.). — The seat of digitalis Emesis. *Am. Journ. Physiol.*, 1929, 90, 377.
71. HANZLICK (P. J.), STOCKTON (A. B.) et DAVIS (S. S.). — Notes on the importance of exact preparation of tincture of digitalis and on the number of pigeons in the pigeon-emesis method. *Journ. of Pharm.*, 1931, 41, 5, 10.
72. HANZLICK (P. J.) and STOCKTON (A. B.). — Results with the Pigeon emesis Method of Estimating the probable therapeutic dose of digitalis. *J. Pharm. and Exp. Ther.*, 1929, 35, 393-407.

73. HANZLICK (P. J.), STOCKTON (A. B.) et TAINTER (M. L.). — Results with the pigeon-emesis method of estimating the potency and full therapeutic dosage of digitalis. *Journ. of Pharmacol. and exp. Therap.*, 1928, 33, 279.
- 73 bis. HASKELL. — *Journ. Pharm. exp. Ther.*, 1928, 33, p. 207.
74. HATCHER (R. A.) et BRODY (J. G.). — The biological standardization of drugs. *Am. Journ. of Pharmacy*, 1910, 82, 360, 37.
75. HATCHER (R. A.) et EGGLESTON (C.). — The emetic action of the digitalis substances. *J. Pharmacol.*, 1912-1913, 4, 113, 134.
76. HATCHER (R. A.). — Oil of strophantus and the emetic action of strophantus. *Journ. Am. Pharm. Assoc.*, 1916, 5, 157-162 (Chem. Abst. 10, 1406).
77. HATCHER (R. A.). — Standardization of digitalis, a preliminary report. *Journ. Am. Pharm. Assoc.*, 1919, 8, 913-914.
78. HATCHER (R. A.) and WEISS (S.). — The seat of the emetic action of digitalis bodies. *Proc. soc. Exp. Biol. and Med.*, 1921, 19, 7, 8.
79. HATCHER (R. A.) and WEISS (S.). — The seat of the emetic action of the digitalis bodies. *Arch. Int. Midi*, 1922, 29, 690-704.
80. HATCHER (R. A.) et WEISS (S.). — The seat of the emetic action of the digitalis bodies. *Journ. of Pharmacol. et exp. Therap.*, 1927, 32, 37, 53.
81. HAUPSTEIN (P.). — Vergleichende Untersuchung der Wirksamkeit herzspezifischer Glykoside zweiter Ordnung. *Arch. f. exp. Path. u. pharm. Bd.*, 1927, 126, 121, 128.
82. HOFFMANN-LAROCHE (F.). — Glucosid of bulbuls scillae. *Brit. Akt. Ges.*, 1925, 255, 689.
83. JULLIEN (A.) and MORIN (G.). — Recherches sur l'automatisme cardiaque chez les mollusques. *J. Physiol. Path. Gén.*, 1932, 30, 990-5.

84. JULLIEN (A.). — Travaux pratiques de Physiologie et principes d'expérimentation, 1935. Imp. J. B. Baillière et fils, Paris.
85. KLEWITZ. — Sur l'absorption de l'alcool par le cœur des animaux à sang chaud en survie. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1923, 99, 250, 52.
86. KNAFFL-LENZ (E.). — The physiological assay of preparations of digitalis. *J. of Pharm. and exp. Ther.*, 1926, 29, 407-425.
87. KNAFFL-LENZ (E.). — Berichte über die Arbeiten und Vorschläge der internationalen Konferenzen, welche von der Hygieneorganisation des Völkerbundes behufs Vereinheitlichung der biologischen Wertbestimmung von Heilmitteln veranstaltet wurde. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1928, 135, 259, 332.
88. KNUDSON (A.). — Assay of digitalis. *M. and Surg. Year Book Phys. Hosp.*, 1929, 1, 146, 153.
89. KROSZCZINSKI (S.). — Digitalistitrierung an Tauben nach Hanzlik und Shoemaker. *Med. Doswiadcz. i. spol.*, 1930, 2, 257.
90. LACOMBE (A.). — Contribution à l'étude anatomique de l'aile du pigeon. *Lyon Th. Méd. Vét.*, 1930.
91. LAUNOY (L.). — Notions de Pharmacodynamie. Leçons sur la toxicité. Imp. J. B. Baillière et fils, Paris.
92. LEHMANN (A. J.) and HANZLICK (P. J.). — Emetic and Fatal Doses of digitalis at High altitudes. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1932, 30, 140, 3.
- 92^{bis}. LEAGUE OF NATIONS. (*Health Organization International*). *Standard preparation of digitalis Leaves*, décembre 1926, janvier 1935.
93. LEHMANN (A. J.) et HANZLICK (P. J.). — Activité comparée de différentes préparations digitaliques d'après la méthode aux Pigeons. *Journ. of Pharm. and exp. Ther.*, 1933, 48, 151.

94. LENDLE (L.) et PUSCH (F.). — Über die Bindung der Digitaliskörper an die Eiweisstoffe des Blutes. *Arch. f. exp. Path. und Pharmakol.*, 1935, 177, 550.
95. LEVY (J.). — Essais et dosages biologiques des substances médicamenteuses. Masson et Cie.
96. LÉVY (Jeanne) et CAHEN (R.). — La toxicité des glucosides digitaliques comme méthode biologique pour leur identification et leur dosage. *Paris Médical*, 1929, 24, 537.
97. LÉVY (J.) et CAHEN (R.). — Dosage biologique et étalonnage de quelques glucosides cardiotoniques, ouabaïne, digitaline, scillarène, cymarine. *B. S. P.*, 1931, 38, 85.
98. LÉVY (J.) et OTTERSTROM (K.). — Dosage biologique des cardiotoniques. Toxicité d'un étalon national de poudre de digitale par rapport à l'étalon international. *Bul. Soc. Chim. Biol. Paris*, 1934, 16, 1518.
99. LÉVY (J.) et PICHOT (H.). — Dosage biologique de la digitale par la méthode de Hatcher-Magnus appliquée au chien. *Bul. Sc. Pharmacol.*, 1929, 36, 693.
100. LIEB (C. C.) et MULINOS (M. G.). — Pigeon emesis and drug action. *J. Pharmacol. and Exp. Therap.*, 1934, 51, 325.
101. LIND (de), VAN WIJNGAARDEN (C.). — Alcokol and Digitalis Extracts. *Arch. f. exp. Path. u. Pharmak.*, 1926, 114, 21, 31.
102. LIND (de), VAN WIJNGAARDEN (C.). — Die Zuverlässigkeit physiologischer Eichungen für Digitalis ausgearbeitet, nebst Untersuchungen über das Trocknen und Aufbewahren der Digitalisblätter. *Inaug. Diss. Utrecht*, 1925, 168.
103. LIND (de), VAN WIJNGAARDEN (C.). — Untersuchungen über die Wirkungsstärke von Digitalis preparaten. V. Die im auftrage der Volkerbund-Konferenzen für biologische Wertbes-

- timungen ausgegebenen Standarpparate von 1923 und 1926. *Arch. f. exp. ath. u. Pharmak.*, 1927, 123, 215, 30.
104. MAGNUS. — Publication of the league of Nations, III. *Health*, 1928, III, 10 Ch. 374, p. 9.
105. MARSIGLIA (M.). — Sull'azione locale d'ell'alcool, del fenolo, della veratrina, delle stricina, della nicotina e della chinidina sulle varie regioni del cuore di *Bufo vulgaris*. *Bull. Soc. Ital. Biol. sper.*, 1932, 7, 1457, 1461.
106. MASCRÉ (M.), LÉVY (J.) et CAHEN (R.). — Sur le dosage biologique des Poudres de Scille. I. Etude du mode d'épuisement optimum de la scille. *B. S. P.*, 1933, 40, 129.
107. MASCRÉ (M.), LÉVY (J.) et CAHEN (R.). — Sur le dosage biologique des poudres de Scille. II. Préparations de la poudre de Scille étalon, *Ibid.*, 47, 1935, p. 66.
108. MASCRÉ (M.), LÉVY (J.) et CAHEN (R.). — Influence de divers facteurs sur la toxicité de la poudre de Scille. *Médecine*, 1933, 14, 689.
109. MÉHÈS (J. Von). — Die Wirkung der Digitalisglykoside bei an Beriberi erkrankten Tauben. *Arch. exp. Path. u. Pharmak.*, 1934, 176, p. 140.
110. NICLOUX (M.). — Recherche sur l'alcool éthylique. I. Microdosage. *Bull. Soc. de la Ch. Bio.*, 1931, 13, 857.
111. NYIRI (W.) et DUBOIS (L.). — Etudes expérimentales sur les tonicardiaques. IV. Les facteurs principaux de la standardisation de la digitale par une nouvelle méthode. *J. Pharm. exp. Ther.*, 1930, 40, 373, 401.
112. NYIRI (W.) et DUBOIS (L.). — Experimental studies on heart tonics. II. The application of biometric methods to digitalis standardization. *Journ. of Pharmacol.*, 1930, 39, 99, 109.

113. OKUSHIMA (K.). — Über die pharmakologische Stellung des Scillaglykoside unter den digitalis, Gruppen. *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1922, 95, 258, 66.
114. OLIARO (Th.) et ROTHLIN (E.). — Recherches quantitatives sur l'intensité de la fixation des glucosides de la Scille sur le cœur de la grenouille. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1928, 131, 138, 151.
115. OTTERSTRÖM (K.). — Contribution à l'étude des dosages biologiques des cardiotoniques. Vigot frères, Paris.
116. PENAU (H.) et SIMONNET (H.). — Règles générales de l'essai biologique des médicaments. *Journ. Pharm. Chim.*, 15, 1932, p. 116.
117. PERROT (Em.) et GORIS (A.). — Sur la composition chimique des noix de Kola. *Bull. Sc. Pharm.*, 1907, 14, 576 et 645.
118. PERROT (Em.). — 33^e Congrès de l'Assoc. Franç. pour l'avancement des Sciences. XV^e section Sc. Pharmacol B. S. P., 1929, 8, 170.
119. *Pharm. U. S. of Am.*, 1926, 10^e édition, p. 330.
- 119 bis. *Pharmacopée Belge*, 4^e édition, 1930, p. 304.
120. RADNÁI (P.). — Die elektrographische Untersuchung der Alkohol wirkung. *Orvosi Heteil*, 1934, 78, 424, 26.
- 120 bis. RAPSON (C. N.) and UNDERHILL (S. W. F.). — L'utilisation des lapins dans les essais de Strophantus et de Scille. *Quart. J. of Pharm. and Pharm.*, 1935, 8, 409.
121. ROSEN (H.). — The Bio-assay of Squill. *J. Amer. Pharm. Assoc.*, 1934, 23, 1180-1185.
122. ROTHLIN (E.). — Quantitative Untersuchungen über die Affinität definierter Glukoside zum Herzen. *Helv. Med. Acta*, 1934, 1, 460.
123. ROTHLIN. — *Schweitz. Med. Wochen*, 1927, 75, 1174.

124. ROTHLIN (E.) et OLIARO (Th.). — Dosage biologique des quantités de glucosides cardio-actifs fixées par le cœur de grenouille. *C. R. Acad. des Sc.*, 1928, 186, 901-02.
125. SANTESSON (C. G.). — Über die Wirkung von Alkohol und einigen anderen Giften auf die Herzhemmung beim Frosch. *Skandinav. Arch. f. Physiol.*, 1934, 69, 255, 292.
126. SCHACKELL. — *Journ. of Gen. Physiol.*, 1923, 5, 783.
127. SCHUNTERMANN (C. E.). — Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung krystallisierter Herzglykoside am intakten Warmblüter. *Zeit. Exp. Med.*, 1932, 81, 519, 525.
128. SCHWARTZ (E. W.), HANN (R. M.) et KEENAN (G. L.). — L'Ouabaïne (g-strophantine ou acokanthérine) étalon physiologique pour la digitale, le strophantus et la scille. *J. Pharm. exp. Ther.*, 1929, 36, 481, 491.
129. SLUYTERS. — *Ber. Klein. Woch.*, 1919, 56, 802.
130. STASIAK (A.) and ZBORAY (B.). — Zur Werbestimmung der Digitalis mit verschiedenen Eichungsverfahren mit besonderer Berücksichtigung der Mansfeldschen Froscherzsinus methode. *Arch. f. exp. Path. a. Pharmak.*, 1929, 144, 283, 96.
131. STASIAK (A.), ZBORAY (B.) and RIGO (L.). — Über die Wertbestimmung von Digitalis präparatur mit verschiedenen Eichungsverfahren (Estimation of Digitalis by different methods). *Arch. f. exp. Path. a. Pharmak.*, 1930, 152, 273, 87.
132. STASIAK (A.). — Biological standardization of scilla and strophantus tinctures by different methods. *Arch. Pharm.*, 1932, 270, 385-391.
133. STASIAK (A.) et ZBORAY (B.). — Über den biologischen Eichungswert mittels verschiedener Verfahren hergestellter Digitalistinkturen. *Arch. Pharmaz.*, 1932, 270, 231.

134. STOCKTON (A. B.). — Clinical dose and effects of digitalis assayed by pigeon method. *Am. Heart Journ.*, 1933, 9, 248.
135. STOLL (A.) et HOFMANN (A.). — Die Hydrierung des Scillarens A und die physiologische Prüfung einiger Scillarenderivate. *Helv. Chimica Acta*, 1935, 18, 401.
136. TAKABE TADASHI. — Vergleichende Untersuchung über die Wertbestimmung der Digitalispräparate. *Jap Journ. Med. Sc. Trans. IV Pharmacol.*, 1934, 8, 141, 144.
137. TAKAHASHI. — Pharmacological investigation of the isolated frog heart by means of the electrocardiograph. *Folia Pharmacol. Jap.* 1933, 16, 135, 140. *Bull. Sc. Pharm.*, 1926, 33, 165.
138. TIFFENEAU (M.). — Document C. 562, M. 183, 1925, III, Ch. 35c. *Soc. des Nations*, Genève, 9 novembre 1925.
139. TIFFENEAU (M.). — 2^e Conférence Internationale pour la standardisation biologique de certains médicaments. *Bull. Sc. Pharm.*, 1926, 33, 165.
140. TIFFENEAU (M.). — Standardisations des sérums et produits biologiques. *Bull. Sc. Pharm.*, 1928, 35, 521.
141. TIFFENEAU (H.), LÉVY (J.), PICHOT (H.). — Dosage biologique de la digitale. *Paris Médical An.*, 1928, 24, 562.
142. TOYOSHIMA. — Über die Wirkung des Alkohols auf das Froschherz. *Folia Pharmacol. Jap.* (Brev. 1928, 8, 1, 2).
143. TREVAN (J. W.). — The Error of Determination of Toxicity. *Proceedings of the Roy. Sc.*, 1927, 101, 483, 514.
144. TREVAN (J. W.), BOOCK, BURN (J. H.) and GADDUM (J. H.). — The Pharmacological assay of Digitalis by different method. *Quarterly Journal of Pharm.*, 1928, 1, 6, 22.

145. VANDERKLEED (Ch. C.). — Variation in the susceptibility of the guinea-pig to the heart-
tonic group. *Journ. Am. Pharm. Assoc.*,
1912, 1, 701, 708.
146. VANDERKLEED (Ch. C.). — Variations in the suscep-
tibility of the guinea pig to the heart tonic
group. *Am. Journ. Pharm.*, 1912, 84, 14, 23.
147. VITA (P.). — Il battito cardiaco nella *Helix Operta*.
Riv. Biol., 1928, 10, 682.
148. WASICKY (R. Dr.). — Leitfaden für die Pharma-
gnostischen Untersuchungen. *Franz Deutsche*, Leipzig, 1936.
149. YAMANOUCHI (K.). — Comparative Studies of phar-
macentical. preparations of the *Digitalis*
group. *Tokoku. J. Exp. Med.*, 1927, 9, 111, 30.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	11
PREMIÈRE PARTIE. — Etude expérimentale de quelques méthodes de dosage biologique de la Scille	17
<i>Chapitre premier.</i> — Origine et préparation des poudres soumises aux essais	21
<i>Chapitre II.</i> — Méthodes de détermination de la toxicité de la Scille par perfusion lente	25
I. — Perfusion lente chez le cobaye	26
II. — Perfusion lente chez le lapin	38
<i>Chapitre III.</i> — Méthodes statistiques de dosage biologique de la Scille	47
I. — Méthode statistique de toxicité sur le ventricule isolé d' <i>Helix pomatia</i>	48
II. — Méthode statistique d'effets émétiques chez le pigeon	66
DEUXIÈME PARTIE. — Etude de la valeur et de la précision des diverses méthodes de dosage employées	85
I. — Détermination des écarts expérimentaux	87
II. — Renseignements fournis par le calcul d'erreurs	90
III. — Comparaison des résultats fournis par les diverses méthodes	97

TROISIÈME PARTIE. — Etude du choix et de la valeur d'un étalon de Scille	101
I. — Etude critique et choix des divers étalons	103
II. — Préparation d'un étalon de Scille .	107
III. — Etude du titre de l'étalon	109
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	113
BIBLIOGRAPHIE	117



IMPRIMERIE SPÉCIALE
DE
MM. VIGOT Frères



